

Aus dem Bereich  
Klinische Medizin - Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Einfluss von Vitamin D auf die tumorspezifische Immunabwehr bei  
Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*

**der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2017

vorgelegt von: Benedikt Balensiefer  
geb. am 28.11.1995 in Mechernich

*In Dankbarkeit meinen lieben Eltern*

*Jule*

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>5</b>
<b>1. Zusammenfassung .....</b>	<b>6</b>
<b>Summary .....</b>	<b>8</b>
<b>2. Einleitung .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region .....</b>	<b>10</b>
2.1.1 Maligne Neubildungen in Deutschland .....	10
2.1.2 Epidemiologie, Ätiologie und Prognoseaussichten .....	11
2.1.3 Klassifikation, Staging und Differenzierung .....	15
2.1.4 Diagnostik und Therapie .....	19
<b>2.2 Vitamin D .....</b>	<b>20</b>
2.2.1 Vitamin-D-Versorgung .....	20
2.2.2 Metabolismus des Vitamin D .....	21
2.2.3 Definition des Vitamin-D-Status .....	22
<b>2.3 Einfluss von Vitamin D auf das Immunsystem .....</b>	<b>25</b>
2.3.1 Vitamin D und das angeborene Immunsystem .....	25
2.3.2 Vitamin D und das adaptive Immunsystem .....	28
2.3.2.1 Zelluläre Grundlagen der adaptiven Immunantwort .....	29
<b>2.4 Eigene Fragestellung .....</b>	<b>33</b>
<b>3. Material/Methoden .....</b>	<b>36</b>
<b>3.1 Material und Herstellernachweis .....</b>	<b>36</b>
3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	36
3.1.2 Lösungen und Puffer .....	37
3.1.3 Chemikalien .....	37
3.1.4 Verwendete Antikörper .....	37
<b>3.2 Fixierung des Gewebes .....</b>	<b>38</b>
<b>3.3 Immunhistologische Färbungen .....</b>	<b>38</b>
3.3.1 Etablierung .....	38
3.3.2 Versuchsablauf .....	41
<b>3.4 Analytische Methoden .....</b>	<b>42</b>
3.4.1 Semiquantitative Auswertung .....	42
3.4.2 Statistische Analyse .....	43
3.4.3 Anonymisiertes Patientenkollektiv .....	44
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
<b>4.1 Beschreibung des Patientenkollektivs .....</b>	<b>48</b>
<b>4.2 Präparat-Charakteristika .....</b>	<b>50</b>
4.2.1 Auswertung Tumoranteil/Stromaanteil .....	51
4.2.2 Leukozytenzahl .....	52
4.2.3. Leukozytenzahl Tumor/Stroma .....	53
4.2.4 Auswertung T- und N-Stadium .....	55
<b>4.3 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen .....</b>	<b>56</b>
4.3.1 Ergebnisse der CD4-Immunhistochemie bei HNSCCs .....	57
4.3.2 Ergebnisse der CD8-Immunhistochemie bei HNSCCs .....	59
4.3.3 Ergebnisse der CD11c-Immunhistochemie bei HNSCCs .....	61
4.3.4 Ergebnisse der CD68-Immunhistochemie bei HNSCCs .....	63
4.3.5 Ergebnisse der CD163-Immunhistochemie bei HNSCCs .....	65
<b>4.4 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse .....</b>	<b>66</b>

4.5 Überlebensanalyse .....	67
5. Diskussion .....	68
6. Literaturverzeichnis .....	79
7. Publikationen .....	87
8. Lebenslauf .....	88
9. Danksagung .....	89



## Abkürzungsverzeichnis

1,25 (OH) D2	Calcitriol
%	Prozent
° C	Grad Celsius
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Tetraethylendiaminoessigsäure
et al.	und andere
g	Gramm
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HE	Hämatoxylin/Eosin
HNSCC	Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region (head and neck squamous cell carcinoma)
HPV	Humaner Papillomvirus/Humane Papillomviren
l	Liter
mg, mm, ml	Milligramm, Millimeter, Milliliter
mM, M	Milli-, Molarität (entspricht der molaren Masse in einem Liter)
min	Minute
µg, µm, µl	Mikrogramm, Mikrometer, Mikroliter
n	Stichprobenumfang
ng, nm	Nanogramm, Nanometer
Nr.	Nummer
n.s.	nicht signifikant
p	statistischer Signifikanzwert
PBS	phosphatgepufferte Standardsalzlösung
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff- ionenkonzentration
RKI	Robert-Koch-Institut
s	Sekunde
SCC	Plattenepithelkarzinom (squamous cell carcinoma)
WHO	Weltgesundheitsorganisation
VDM	Patientenkollektiv mit Vitamin-D-Mangel
VDA	Patientenkollektiv mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung

### 1. Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich gehören, mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 50 %, zu den Tumorerkrankungen mit einer sehr schlechten Prognose, die sich auch in den letzten Jahrzehnten bei nur wenigen neuen Behandlungsansätzen nicht wesentlich verbessert hat. Ursache hierfür ist zum einen die in der Mehrzahl der Fälle erst sehr späte Diagnosestellung, zum anderen stellt die Behandlung dieser Tumorerkrankungen für Ärzte wie auch die Patienten eine große Herausforderung dar. Aus diesem Grund muss nach Methoden geforscht werden, die den Patienten neue Therapieoptionen ermöglichen. Ein Ansatz stellt dabei das Vitamin D mit seinen vielfältigen Wirkungen auf den menschlichen Organismus dar. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich häufig einen deutlichen Vitamin-D-Mangel aufweisen. In Zusammenhang mit der in den zurückliegenden Jahren gewonnenen Erkenntnis, dass Vitamin D einen entscheidenden Einfluss auf das Immunsystem hat, stellt sich die Frage, inwieweit bei Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor Vitamin D die Immunabwehr im Allgemeinen und insbesondere die antitumorale Funktion des Immunsystems beeinflussen kann.

Dazu wurden in dieser Arbeit, aus einem Kollektiv von 103 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich, von denen 44 einen ausreichenden Vitamin-D-Serumspiegel ( $> 15$  ng/ml) und 59 einen Vitamin-D-Mangel aufwiesen ( $< 10$  ng/ml), immunhistochemische Färbungen entsprechender Tumorgewebeproben angefertigt mit dem Ziel, verschiedene Immunzellpopulationen im Tumor sowie im peritumoralen Stroma zu charakterisieren. Hierbei wurden zur Detektion von Lymphozyten CD4-Antikörper (T-Helferzellen) und CD8-Antikörper (zytotoxische T-Zellen) verwendet. Um Makrophagen nachzuweisen, wurde ein CD11c-Antikörper eingesetzt, der vornehmlich M1-Makrophagen darstellt, ein CD163-Antikörper, der die M2-Makrophagenpopulation abbildet und ein CD68-Antikörper, der als Panmakrophagenmarker dient.

In der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen mit einem immunreaktiven Score zeigte sich, dass bei ausreichender Vitamin-D-Versorgung die intra- und peritumorale Infiltration mit Lymphozyten- und M1-Makrophagen (exemplarisch dargestellt durch die Antikörper CD4, CD8, CD11c und CD68) deutlich gesteigert ist. Insbesondere die

intratumorale Infiltration durch die genannten Immunzellpopulationen wird durch eine suffiziente Versorgung mit Vitamin D signifikant stimuliert.

Im Gegensatz dazu zeigte sich für die mit dem CD163-Antikörper detektierten M2-Makrophagen eine gesteigerte peritumorale Infiltration bei Vitamin-D-Mangel. Da M2-Makrophagen eine überwiegend immunsupprimierende Wirkung haben, deuten diese Ergebnisse übereinstimmend mit den dargestellten Ergebnissen der T-Helferzellen, zytotoxischen T-Zellen und M1-Makrophagen auf eine Stimulation der antitumoralen Aktivität des Immunsystems durch Vitamin D bei Kopf-Hals-Tumorpatienten hin. In der Überlebensanalyse zeigte sich, dass darüber hinaus eine ausreichende Vitamin-D-Versorgung bei diesen Patienten auch zu einem signifikant verbesserten Gesamtüberleben führte. Das mediane Überleben lag dabei bei Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel bei 21 Monaten, während Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung im Schnitt 31 Monate länger lebten mit einem medianen Gesamtüberleben von 31 Monaten.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit anhand von semiquantitativen histologischen Untersuchungen gezeigt werden, dass eine ausreichende Vitamin-D-Versorgung für Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich von hoher Relevanz ist. Sie ist nicht nur mit einer gesteigerten Immunzellinfiltration im Tumor sowie im peritumoralen Stroma assoziiert, sondern korrelierte in der vorgelegten Arbeit auch mit einer signifikant verbesserten Prognose. Daher sind weitere, in dieser Arbeit nicht vorgenommene molekulare Untersuchungen nötig, um die Vitamin-D-Wirkungen zu entschlüsseln. Es finden sich aber dennoch Anhaltspunkte in dieser Arbeit, dass auch in der klinischen Praxis der Vitamin-D-Versorgung von Kopf-Hals-Tumorpatienten mehr Beachtung geschenkt werden sollte, da sich hier die Möglichkeit bietet, durch eine kostengünstige und sichere Therapie positive Effekte für die Patienten zu erreichen.

### Summary

Head and neck squamous cell carcinoma is a tumor entity with a 5-year survival rate of 50 %, a very poor prognosis that has not substantially improved in the last decades, as only few novel treatment approaches have emerged. Key reasons for this are the very late-stage diagnosis of the majority of cases as well as the significant challenge that the treatment of these cancers represents for both physicians and patients. There is therefore a need for research towards methods that can offer patients new treatment options. A promising candidate for this is vitamin D and its numerous effects on the human organism. Several studies have shown that patients with head and neck squamous carcinomas often display a significant vitamin D deficiency. Considering the evidence gathered in recent years that vitamin D has a crucial modulatory effect on the immune system, the question arises to what extent vitamin D may influence the immune response in head and neck cancer patients, both in general and specifically in regards to antitumor immunity.

To address this, an immunohistochemical analysis was performed on tumor tissue samples isolated from a cohort of 103 head and neck squamous cell carcinoma patients, of which 44 had adequate serum levels of vitamin D ( $> 15$  ng/ml) while 59 exhibited a vitamin D deficiency ( $< 10$  ng/ml), in order to characterize the different immune cell populations present in the tumor as well as the peritumoral stroma. Lymphocytes were detected using a CD4 antibody (for T-helper cells) and a CD8 antibody (for cytotoxic T cells). Macrophages were identified with a CD11c antibody primarily labeling M1 macrophages, a CD163 antibody targeting the M2 macrophage population and a CD68 antibody serving as a pan-macrophage marker.

The evaluation of the immunohistochemical stainings with an immunoreactive score showed that an adequate vitamin D status was associated with a significant increase in the intra- and peritumoral infiltration of lymphocytes and M1 macrophages (as revealed by the CD4, CD8, CD11c and CD68 antibodies). Particularly the intratumoral infiltration of these immune cell populations was significantly stimulated by sufficient vitamin D levels. In contrast, vitamin D deficiency correlated with an increased peritumoral infiltration of the M2 macrophage population detected with the CD163 antibody. Considering that M2 macrophages are predominantly immunosuppressive, this observation and the results obtained for T-helper cells, cytotoxic T cells and M1 macrophages concord to suggest that vitamin D stimulates the

antitumor activity of the immune system in head and neck cancer patients. Furthermore, the survival analysis showed that an adequate vitamin D status was also linked to significantly better overall survival in these patients. Median survival was 21 months for patients with a vitamin D deficiency, whereas patients with sufficient vitamin D levels lived 10 months longer on average, with a median overall survival of 31 months.

In summary, semiquantitative histological studies have shown that an adequate vitamin D status is of high relevance for patients with head and neck squamous cell carcinoma. It is not only associated with increased immune cell infiltration in the tumor and in the peritumoral stroma, but also correlated in the presented work with a significantly improved prognosis. Therefore, further molecular studies, that were not done in this work are needed to decipher the vitamin D effects. However, there are still indications in this work that more importance should be given to the vitamin D levels of head and neck cancer patients in the clinic, as this offers an opportunity to achieve positive outcomes in patients through a safe and cost-effective therapy.

## 2. Einleitung

### 2.1 Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region

#### 2.1.1 Maligne Neubildungen in Deutschland

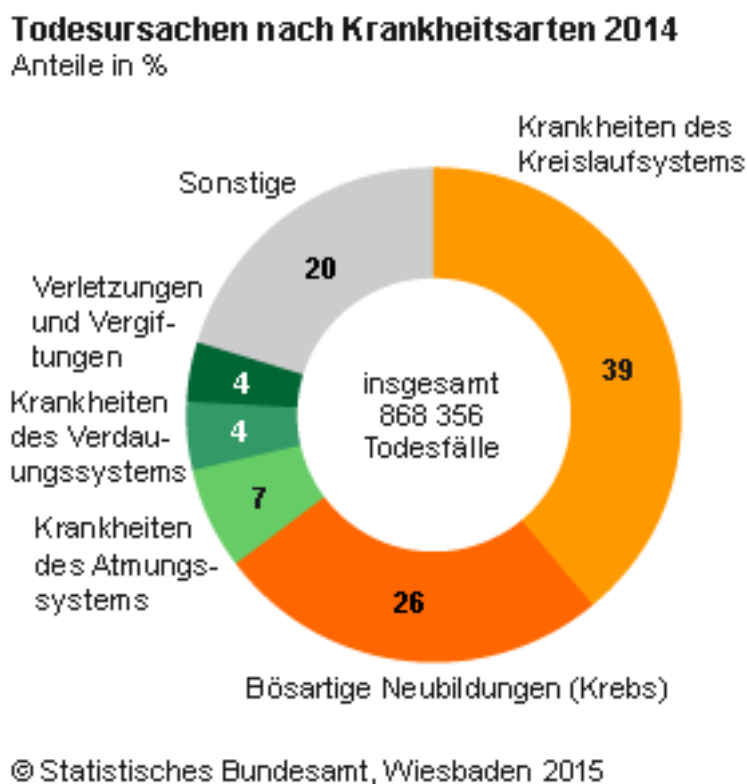
Die Todesursachen durch unterschiedliche Krankheiten sind in vielen Ländern verschieden. Sie sind abhängig von dem Niveau der medizinischen Versorgung, der demografischen Situation, den klimatischen Bedingungen und dem regionalspezifischen Gesundheitsbewusstsein (WHO, Causes of death, by WHO region 2017). Im Folgenden wird in erster Linie auf die Krankheiten Rücksicht genommen, die in Deutschland für die meisten Todesfälle verantwortlich sind. An Platz eins stehen die Erkrankungen des Kreislaufsystems mit 39 %, wie die koronare Herzkrankheit, Bluthochdruck und Myokardinfarkte gefolgt von den bösartigen Neubildungen mit 26 % (Gaber & Wildner 2011). Damit sind alleine Herz-Kreislauf- und Tumorerkrankungen für fast zwei Drittel der Todesfälle in Deutschland verantwortlich. Seit 1998 ist die Anzahl der Krebsneuerkrankungen stetig gestiegen. Bei Männern hat die Inzidenz in dem Zeitraum von 2000 bis 2010 um 21 % zugenommen, bei Frauen um 14 % (Gaber & Wildner 2011; Kaatsch et al. 2015). Wesentliche Gründe dafür sind zum einen die Veränderung der Altersstruktur in Deutschland mit einem verstärkten Anteil an älteren Menschen sowie zum anderen eine verbesserte Diagnostik, mit der immer mehr maligne Veränderungen frühzeitig entdeckt werden können.

In Deutschland wurde im Jahr 2012 bei insgesamt über 477.000 Menschen eine Krebserkrankung diagnostiziert. Im selben Jahr starben über 220.000 Patienten an einer malignen Neubildung.

Bei Männern ist das Prostatakarzinom mit 25,3 % gefolgt von dem Bronchialkarzinom (13,7 %) und dem kolorektalen Karzinom (13,4 %) die am häufigsten diagnostizierte maligne Tumorerkrankung. Frauen sind am häufigsten von Brustdrüsenkrebs (30,8 %), Darmkrebs (12,6 %) und Lungenkrebs (8,0 %) betroffen.

Ein Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region wurde im Jahr 2012 bei über 12.000 Männern (4,8 % aller diagnostizierten Tumorentitäten) diagnostiziert. Frauen sind in der Regel deutlich seltener von Kopf-Hals-Tumoren betroffen. So erkrankten im Jahr 2012 etwa 4.000 Frauen an einem Kopf-Hals-Karzinom, was etwa 1,7 % aller malignen Neubildungen entspricht. Damit stehen im Gesamten Kopf-Hals-Tumoren an vierter Stelle der häufigsten Tumorerkrankungen in Deutschland (Abb. 1). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt derzeit bei Männern bei etwa 45 %, die 10-Jahres-Überlebensrate bei nur 35 %. Bei den Frauen liegt die

Überlebensrate nach 5 Jahren bei etwa 60 % und nach 10 Jahren bei etwa 50 %. Damit sind Kopf-Hals-Karzinome hinsichtlich der Prognose für die Patienten verglichen mit anderen Tumorentitäten im untersten Drittel einzuordnen.



**Abbildung 1:** In der Abbildung des Statistischen Bundesamts sind in einem Kreisdiagramm die Todesursachen nach Krankheiten 2014 dargestellt. Angeführt wird die Statistik von Krankheiten des Kreislaufsystems mit 39 % gefolgt von bösartigen Neubildungen (Krebs) mit 26 %. Sonstige Todesfälle machen 20 % aus, Krankheiten des Atmungssystems 7 % und Krankheiten des Verdauungssystems und Verletzungen und Vergiftungen machen jeweils 4 % aus (Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, 2015)

Nicht nur in Deutschland kommt es zu einem vermehrten Auftreten von Tumoren. Auch weltweit nimmt die Inzidenz von malignen Neubildungen von Jahr zu Jahr zu. Wurden im Jahr 2000 noch etwa 10 Millionen Tumorerkrankungen diagnostiziert, so waren es im Jahr 2010 bereits 12,3 Millionen (Boenninghaus & Lenarz 2001).

Die Überlebenswahrscheinlichkeit hängt dabei auch in großem Maß von dem jeweiligen Land ab. So beträgt zum Beispiel die 5-Jahres-Überlebensrate für Prostatakrebs in den USA 95 %, in Thailand nur 60 % (Allemani et al. 2015). Dies lässt sich auf die jeweilige medizinische Infrastruktur zurückführen.

### 2.1.2 Epidemiologie, Ätiologie und Prognoseaussichten

In Deutschland erkrankten jährlich ca. 13.000 Männer und etwa 4.500 Frauen an einem Kopf-Hals-Karzinom. Zu dieser Tumorentität zählen maligne Tumoren der Lippe, der Mundhöhle,

## 2. Einleitung

---

des Rachens und des Kehlkopfs. In 95 % der Fälle handelt es sich dabei histologisch um Plattenepithelkarzinome. Todesursache war diese Erkrankung im Jahr 2014 bei etwa 5.500 Männern und 1.700 Frauen. Der deutliche Unterschied in der Inzidenz dieser Tumorerkrankungen bei Frauen und Männern lässt sich durch die häufigsten Risikofaktoren und den damit verbundenen, geschlechtsspezifischen Präferenzen erklären (Robert-Koch Institut 2015), auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

Damit ein Tumor entstehen kann, müssen in den betroffenen Zellen mehrere Genstrukturen mutiert sein und diese Mutationen in Kombination wirken, damit die vorliegenden Genveränderungen auf die Tochterzellen übertragen werden. Diese Mutationen können spontan oder durch mutagene chemische Substanzen, Viren oder Strahlung verursacht werden (Löffler & Petrides 2013; Schmoll et al. 2013). Es kommt dabei zu einer Aktivierung von Onkogenen und zu einer Hemmung von Tumorsuppressorgenen. In Folge kommt es zu einer Entdifferenzierung der Zellen, die sich durch ein enthemmtes Wachstum kennzeichnen.

Je mehr karzinogene Einflüsse auf den Organismus einwirken, umso höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass es zu einer Entartung der Zellen kommt. Als generelle Risikofaktoren für die Tumorentstehung gelten eine familiäre Disposition, das Alter, da die einzelnen Schädigungen mit zunehmendem Alter akkumulieren, die Ernährung, zellschädigende Genussmittel wie Tabak- und Alkoholkonsum, Umweltfaktoren wie ionisierende Strahlung oder UV-B-Licht und die hormonelle Situation, da manche Hormone als Wachstumsfaktoren wirken können (Löffler & Petrides 2013; Preiß et al. 2014).

Für die Genese von Kopf-Hals-Tumoren sind in erster Linie Alkohol- und Tabakkonsum sowie Viren des HPV-Typs verantwortlich. Diese Risikofaktoren werden im Folgenden näher erläutert.

Das Rauchen und/oder der Alkoholkonsum sind in 75 % der Fälle verantwortlich für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle, des Oropharynx, des Hypopharynx und des Larynx. In Verbindung beider Noxen kommt es dabei nicht zu einem additiven, sondern sogar zu einem Multiplikationseffekt (Kaatsch et al. 2015), der sich in einer hohen Odds Ratio von 177 niederschlägt.

Untersuchungen zu den Risikofaktoren von Kopf-Hals-Tumoren durch das Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium konnten zeigen, dass Tabakkonsumenten, die keinen Alkohol konsumieren, ein erhöhtes Risiko haben, an Kopf-Hals-Tumoren zu erkranken. Die



## 2. Einleitung

---

Odds Ratio beträgt im Vergleich zu Patienten, die nie geraucht haben, 19,8. Hier besteht eine klare Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Konsumdauer, -menge und -häufigkeit. Bei isoliertem Tabakkonsum ist dabei das Risiko größer, an einem Larynxkarzinom zu erkranken, als die Wahrscheinlichkeit, ein Mundhöhlen- oder Pharynxkarzinom zu entwickeln (Hashibe et al. 2009). Dieses Ergebnis wird von mehreren Studien unterstützt, die ebenfalls zu dem Schluss kamen, dass es einen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Entstehung des Larynxkarzinoms und Nikotinkonsum gibt (Lubin et al. 2009; Vineis et al. 2004).

Eine wichtige Rolle hat auch die geografische Lage in Bezug auf die Verbreitung und Lokalisation von Kopf-Hals-Karzinomen, da sich in den verschiedenen Ländern die gesetzlichen Grundlagen zu den Inhaltsstoffen von Zigaretten unterscheiden. Nitrosamine und polyzyklische aromatische Hydrocarbonate variieren dabei in ihrer Konzentration von Land zu Land und haben so einen unterschiedlich starken Einfluss auf die kanzerogene Wirkung (Elwood et al. 1984; Spitz et al. 1988; Tuyns et al. 1988; Garrote et al. 2001).

Bei separater Betrachtung von reinen Alkoholkonsumenten lässt sich laut der Studie des Head and Neck Cancer Epidemiology Consortiums feststellen, dass die am Tag konsumierte Alkoholmenge einen wesentlichen Einfluss auf das Tumorrisiko hat. Die Odds Ratio liegt hier bei 5,9. Eine Dosis-Wirkungsbeziehung besteht am ehesten für Pharynxkarzinome. Zudem spielt die Konzentration des Alkohols eine Rolle. So hat hochprozentiger Alkohol eine stärkere karzinogene Wirkung als niedrigprozentiger Alkohol (Castellsagué et al. 2003). Ein deutlich erhöhtes Risiko besteht ab einer konsumierten Alkoholmenge von 25 g pro Tag (Streppel et al. 2009).

Ähnlich wie beim Tabakkonsum sinkt auch beim Alkoholkonsum das Risiko bei Abstinenz. So wird nach zehn bis zwanzig Jahren ein ähnliches Risiko erreicht, wie bei jemandem, der nie in großen Mengen Alkohol konsumiert hat. Dieser Zusammenhang gilt in erster Linie für Mundhöhlen- und Larynxkarzinome. Bei Pharynxkarzinomen findet erst nach 20 Jahren eine Risikoreduktion um 40 % statt (Castellsagué et al. 2003).

Als zweiter wesentlicher Risikofaktor für die Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen konnte eine Infektion mit humanen Papillomviren (HPV) der High-Risk-Gruppe identifiziert werden. Eine HPV-Infektion ist assoziiert mit verschiedenen gutartigen Hautveränderungen (z. B. Warzen) und Schleimhauttumoren (z. B. Papillome), einige der mehr als 70 bekannten Serotypen können allerdings auch zur Entstehung maligner Neubildungen führen.

Die Infektion mit humanen Papillomviren erfolgt bei benignen Hautveränderungen hauptsächlich über den Kontakt mit erregerehaltigem Warzenmaterial. Zum Eintritt in die Haut genügen geringste Läsionen. Das Virus besiedelt Zellen der epithelialen Basalschicht und

## 2. Einleitung

---

repliziert sich episomal. Bei der Differenzierung in Keratinozyten wird das Virusmaterial immer weitergegeben, bis die differenzierten Zellen des Stratum corneum einen vollständigen, produktiven Vermehrungszyklus des Virus erlauben. Grundlage dafür ist allerdings eine Proliferation der Wirtszelle. Antiproliferative Tumorsuppressorproteine wie p53 und EB 105 werden durch den Einfluss der viralen Proteine E6 und E7 behindert und erlauben so eine Virusreplikation. Die Folge ist eine massive Virusproliferation in den obersten Zellschichten und eine damit verbundene Bildung von Warzen (Hof & Dörries 2017). Die Pathogenese benigner Schleimhauttumoren ist dem dargestellten Mechanismus der Entstehung von Warzen vergleichbar.

Bei der Entstehung von malignen Veränderungen gibt es auf molekularer Ebene einige Unterschiede zu dem zuvor dargestellten Prozess. Der wichtigste ist, dass das Virusgenom nicht episomal vorliegt, sondern in die Zell-DNA integriert wird. Dadurch kommt es zu dem Verlust des viralen Gens E2, welches die viralen Gene E6 und E7 kontrolliert. Fällt diese Kontrolle weg, kommt es zu einer massiven Produktion der viralen Proteine E6 und E7, welche nun die Funktion der zellulären Tumorsuppressorproteine stark einschränken. Hinzu kommt, dass die Proteine der HPV-High-Risk-Typen eine deutlich höhere Affinität zu den Entryrezeptoren der Basalzellen haben als die der Low-Risk-Typen (Hof & Dörries 2017).

Zu den High-Risk-Typen zählen die HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 (Hof & Dörries 2017; Betiol et al. 2013; Kreimer et al. 2005). Einige dieser Typen wurden in Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle, des Oropharynx und des Larynx nachgewiesen (Marur et al. 2010; Attner et al. 2010; Betiol et al. 2013; Kreimer et al. 2005), wobei in > 90 % der HPV-assoziierten Kopf-Hals-Karzinome HPV-16 das karzinogene Agens darstellt. Im Vergleich zu den Zervixkarzinomen spielt HPV-18 eine deutlich geringere Rolle, ohne dass die genaue Ursache für diese unterschiedliche Verteilung der HPV-Typen bisher bekannt ist.

Hinsichtlich der Prognose stellt sich das HPV-assoziierte Plattenepithelkarzinom im Vergleich zu den noxeninduzierten Kopf-Hals-Karzinomen als günstiger dar. Dies lässt sich zum Teil damit erklären, dass Patienten mit einem HPV-assoziierten Plattenepithelkarzinom im Durchschnitt deutlich jünger sind und jüngere Patienten in der Regel eine bessere Immunfunktion haben als ältere Menschen, was an dieser Stelle die Frage aufwirft, inwieweit das Immunsystem einen Einfluss auf die Tumorabwehr und das Überleben der Patienten hat. Daneben zeigte sich in klinischen Studien, dass Patienten mit HPV-assoziierten Kopf-Hals-Karzinomen deutlich besser auf eine Strahlen- und Chemotherapie ansprechen, was ebenfalls

## 2. Einleitung

---

zur Verbesserung der Prognose beiträgt (Mehanna & Ang 2012). Auf welchen molekularen Mechanismen diese Unterschiede beruhen, ist bisher nur unzureichend verstanden.

Weitere Risikofaktoren sind eine Sonnenexposition, welche zur Entstehung von Lippen Tumoren führen kann, weitere chemische und physikalische Noxen wie beispielsweise Asbest, Nickel und Kokereigase sowie eine Infektion mit Epstein-Barr-Viren, die im weiteren Verlauf zur Entwicklung eines Nasenrachenkarzinoms führen können (Boenninghaus & Lenarz 2001; Garbe 2006).

Dass zunehmend mehr Frauen an Kopf-Hals-Karzinomen erkranken, zeigt sich bei Betrachtung der Geschlechterverteilung bei Sterblichkeit und Inzidenz unter Berücksichtigung des altersstandardisierten langfristigen Trends: Frauen erkrankten in Bezug auf die altersstandardisierten Daten in den Jahren von 2003 bis 2013 um 1,3 % häufiger, während bei den Männern diese Rate im selben Zeitraum um 0,6 % sank (Gaber & Wildner 2011; Kaatsch et al. 2015).

### 2.1.3 Klassifikation, Staging und Differenzierung

Die Klassifikation von Tumoren wird durch ein weltweit anerkanntes Klassifikationssystem, das TNM-System, vereinheitlicht, welches von der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) erstmals im Jahr 1950 erstellt wurde und seither regelmäßig aktualisiert wird.

Dabei steht das „T“ für die Ausdehnung und die Größe des Primärtumors, das „N“ für den Befall von Lymphknoten und das „M“ für Fernmetastasen. Mithilfe weiterer Zusatzziffern wird das System unterteilt und somit detaillierter. Wird der Diagnose das Präfix „c“ vorangestellt, handelt es sich um eine klinische Diagnose, während die Voranstellung des Präfix „p“ auf eine pathologische Diagnose hinweist. Die sechste TNM-Klassifikation für Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs aus dem Jahr 2002 ist in Tabelle 1 im Detail dargestellt (Barnes et al. 2010). Auch wenn seit dem Jahr 2017 eine siebte Ausgabe der TNM-Klassifikation der Kopf-Hals-Karzinome verfügbar ist, die zahlreiche Änderungen insbesondere hinsichtlich der Unterscheidung HPV- und noxenassoziierter Kopf-Hals-Karzinome enthält, wurde aufgrund der Rekrutierungszeit der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Fälle aus den Jahren 2013 bis 2016 die sechste Version des TNM-Klassifikationssystems genutzt.

Das Staging hat nicht nur für die klinische Praxis, sondern auch für die Forschung eine besondere Bedeutung, da es eine möglichst genaue Erfassung der Tumoren ermöglicht und so beurteilt werden kann, ob es im Verlauf zu einer Größenzu- oder -abnahme gekommen ist und das Ausmaß der Metastasierung genau erfasst und quantifiziert werden kann. Des Weiteren

## 2. Einleitung

hilft das TNM-Stadium, die Prognose der Patienten einzuschätzen, und gibt einen groben Überblick über die Homogenität der einzelnen Fallgruppen in klinischen Studien.

**Tabelle 1:** TNM-Stadien bei Kopf-Hals-Tumoren

Einteilung	Beschreibung
T	Primärtumor
Tx	Keine Beurteilung des Primärtumors möglich
T0	Kein Hinweis auf einen Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
Mundhöhle	
T1	Tumor $\leq 2$ cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor $> 2$ cm, aber $\leq 4$ cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor $> 4$ cm in größter Ausdehnung
T4a	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen, wie kortikale Knochen, tiefe äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), Kieferhöhle oder Gesichtshaut
T4b	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen, wie Mastikatorraum, Pterygoidplatten oder Schädelbasis; oder umschließt die A. carotis interna
Oropharynx	
T1	Tumor $\leq 2$ cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor $> 2$ cm, aber $\leq 4$ cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor $> 4$ cm in größter Ausdehnung
T4a	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen, wie Larynx, äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), Lamina medialis des Processus pterygoideus, hartem Gaumen und Unterkiefer
T4b	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen, wie M. pterygoideus lateralis, Lamina lateralis des Processus pterygoideus, Schädelbasis; oder umschließt A. carotis interna
Hypopharynx	
T1	Tumor auf einen Unterbezirk des Hypopharynx begrenzt und $\leq 2$ cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor infiltriert mehr als einen Unterbezirk des Hypopharynx oder einen benachbarten Bezirk oder $> 2$ cm, aber $\leq 4$ cm in größter Ausdehnung, ohne Fixation des Hemilarynx
T3	Tumor $> 4$ cm in größter Ausdehnung oder Primärtumor oder Fixation des Hemilarynx
T4a	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen, z. B. Schild-/Ringknorpel, Zungenbein, Schilddrüse, Ösophagus, zentrale Weichteile des Halses
T4b	Tumor infiltriert prävertebrale Faszien, umschließt A. carotis interna oder infiltriert Strukturen des Mediastinums
Larynx Supraglottis	
T1	Tumor auf einen Unterbezirk der Supraglottis begrenzt, mit normaler Stimm lippenbeweglichkeit
T2	Tumor infiltriert mehr als einen benachbarten Unterbezirk der Supraglottis oder Glottis oder eines Areals außerhalb der Supraglottis

## 2. Einleitung

	(z. B. Schleimhaut von Zungengrund, Vallecula, mediale Wand des Sinus piriformis) befallen, ohne Fixation des Larynx
T3	Tumor auf den Larynx begrenzt, mit Stimmlippenfixation, und/oder Tumor mit Infiltration des Postkrikoidbezirks, des präepiglottischen Gewebes und/oder geringgradiger Erosion des Schildknorpels (innerer Kortex)
T4a	Tumor infiltriert durch den Schildknorpel und/oder breitet sich außerhalb des Kehlkopfes aus, z. B. Trachea, Weichteile des Halses eingeschlossen äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), gerade Halsmuskulatur, Schilddrüse, Ösophagus
T4b	Tumor infiltriert den Prävertebralraum, mediastinale Strukturen oder umschließt die A. carotis interna
Larynx Glottis	
T1	Tumor auf Stimmlippe(n) begrenzt (kann auch vordere oder hintere Kommissur befallen), mit normaler Beweglichkeit
T1a	Ausdehnung auf eine Stimmlippe begrenzt
T1b	Befall beider Stimmlippen
T2	Tumor breitet sich auf Supra- und/oder Subglottis aus und/oder mit eingeschränkter Beweglichkeit der Stimmlippen
T3	Tumor auf den Larynx beschränkt, mit Stimmlippenfixation und/oder Invasion der Postkrikoidgegend und/oder des präepiglottischen Gewebes und/oder des paraglottischen Raumes mit geringgradiger Erosion des Schildknorpels (innerer Kortex)
T4a	Tumor infiltriert durch den Schildknorpel und/oder breitet sich außerhalb des Kehlkopfes aus, z. B. Trachea, Weichteile des Halses eingeschlossen äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), gerade Halsmuskulatur, Schilddrüse, Ösophagus
T4b	Tumor infiltriert den Prävertebralraum, mediastinale Strukturen oder umschließt die A. carotis interna
Larynx Subglottis	
T1	Ausdehnung begrenzt auf die subglottische Region
T2	Ausbreitung auf eine oder beide Stimmlippen, diese mit normaler oder eingeschränkter Beweglichkeit
T3	Tumor auf den Larynx begrenzt, mit Stimmlippenfixation
T4a	Tumor infiltriert durch den Schildknorpel und/oder breitet sich außerhalb des Kehlkopfes aus, z. B. Trachea, Weichteile des Halses eingeschlossen äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), gerade Halsmuskulatur, Schilddrüse, Ösophagus
T4b	Tumor infiltriert den Prävertebralraum, mediastinale Strukturen oder umschließt die A. carotis interna
N	Regionäre Lymphknotenmetastasen (Halslymphknoten)
NX	Keine Beurteilung der regionären Lymphknoten möglich
N0	Keine regionäre Lymphknotenmetastasierung
N1	Metastasierung in einem ipsilateralen Lymphknoten, $\leq 3$ cm in größter Ausdehnung

## 2. Einleitung

N2a	Metastasierung in einem ipsilateralen Lymphknoten, > 3 cm, aber ≤ 6 cm in größter Ausdehnung
N2b	Metastasierung in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, ≤ 6 cm in größter Ausdehnung
N2c	Metastasierung in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, ≤ 6 cm in größter Ausdehnung
N3	Metastasierung in Lymphknoten > 6 cm in größter Ausdehnung
M	Fernmetastasen
MX	Keine Beurteilung der Fernmetastasen möglich
M0	Kein Nachweis von Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen nachweisbar - Die betroffenen Organe werden mit einem Affix gekennzeichnet: PUL: Lunge      MAR: Knochenmark      OSS: Knochen HEP: Leber      PER: Peritoneum      PLE: Pleura BRA: ZNS      ADR: Nebenniere      LYM: Lymphknoten SKI: Haut      OTH: Andere

Nach dem TNM-System würde beispielsweise ein Plattenepithelkarzinom im Frühstadium ohne Nachweis von Lymphknotenmetastasierung und Fernmetastasierung mit T1N0M0 bezeichnet werden.

Auf dem TNM-System basiert nach Vorgaben der UICC eine weitere Klassifikation, die das klinische Tumorstadium beschreibt (Tabelle 2).

**Tabelle 2:** Klinische Stadieneinteilung von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region (Barnes et al. 2010)

klinisches Stadium	TNM-Stadium		
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1, T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
IVa	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
IVb	T4b	alle N	M0
	alle T	N3	M0
IVc	alle T	alle N	M1

Des Weiteren gibt es eine histologische Klassifikation des Differenzierungsgrades von Plattenepithelkarzinomen, der häufig Rückschlüsse auf die Malignität der Tumoren zulässt. Diese ist in der nachfolgenden Tabelle 3 definiert.

**Tabelle 3:** Histologische Klassifikation des Differenzierungsgrades von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region.

Differenzierungsgrad	Beschreibung
G1	gut differenziert, wenig Mitosen
G2	mäßig differenziert
G3	schlecht differenziert, viele Mitosen

### 2.1.4 Diagnostik und Therapie

Die 5-Jahres-Überlebensrate eines Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich beträgt derzeit trotz moderner Techniken und dem aktuellen Stand der Medizin nur etwa 50 % (Wolff, Follmann & Nast 2012a). Mithilfe neuer diagnostischer Verfahren, die derzeit in der klinischen Erprobung sind, und neuen OP-Methoden kann diese Zeit in Zukunft möglicherweise verlängert werden. Wichtig sind hierbei aber auch präventive Maßnahmen, die das Immunsystem stärken und den Körper bei der eigenen Tumorabwehr unterstützen und gegebenenfalls das Tumorwachstum verlangsamen oder gar verhindern. Für den Patienten sollten diese Maßnahmen einfach und finanzierbar sein, aber dennoch eine therapeutische Wirkung haben.

Zur weiteren diagnostischen Abklärung sollten alle Patienten, die eine unklare Schleimhautveränderung im Kopf-Hals-Bereich über mehr als zwei Wochen haben, zum Spezialisten überwiesen werden (i. d. R. ein HNO-Facharzt). Bei den beschriebenen Veränderungen kann es sich beispielsweise um weiße oder rote Flecken auf der Mundschleimhaut, einen Schleimhautdefekt im Bereich der Mundhöhle, unklare Zahnlockerungen, ein persistierendes Fremdkörpergefühl, Schmerzen, Schluckstörungen, Schwierigkeiten beim Sprechen, eine verminderte Zungenbeweglichkeit, unklare enorale Blutungen, Schwellungen am Hals oder einen Foetor ex ore handeln.

Im Rahmen der Primärdiagnostik sollte eine Hals-Nasen-Ohrenärztliche Untersuchung durchgeführt werden und bei klinischem Verdacht auf einen malignen Tumor zunächst eine Panendoskopie durchgeführt werden, die eine Naso-/Oro-/Hypopharyngoskopie, Tracheobronchoskopie, Mikrolaryngoskopie und Ösophagogastroskopie umfasst. Zum Ausschluss einer pulmonalen und hepatischen Metastasierung sollte zudem ein Thorax- und Abdomen-CT durchgeführt werden. Liegt der Verdacht nahe, dass es sich um ein Tumorrezidiv handeln könnte, kann ergänzend ein Positronen-Emissions-Tomographie(PET)-CT sinnvoll sein, da in Metaanalysen in dieser Situation eine höhere Sensitivität (80 %) nachgewiesen werden konnte (Wolff, Follmann & Nast 2012b).

Welcher Ansatz gewählt wird, um den Tumor zu bekämpfen, hängt davon ab, was innerhalb eines interdisziplinären Tumorboards unter Beteiligung von unterschiedlichen Fachrichtungen wie der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, der Strahlentherapie, der Onkologie, der Pathologie und der Radiologie und unter Berücksichtigung der Wünsche des Patienten entschieden wird. Es handelt sich hierbei um eine Einzelfallentscheidung, sodass eine Pauschalisierung der Therapie nicht möglich ist.

### 2.2 Vitamin D

#### 2.2.1 Vitamin-D-Versorgung

Wie in den oberen Abschnitten dargelegt, stellen bösartige Neubildungen im menschlichen Organismus ein großes weltweites Problem dar, an dem jährlich viele Menschen sterben. Die Behandlungsmöglichkeiten sind oft begrenzt und die Überlebenschancen in vielen Fällen schlecht. Dies gilt insbesondere für Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs, welche aufgrund ihrer Inzidenz eine nicht unerhebliche Rolle in der Tumorst Statistik spielen. Aus diesen Gründen sollte nach verschiedenen Möglichkeiten gesucht werden, um das Behandlungsspektrum dieser Karzinome zu erweitern und den Patienten ein besseres Überleben ermöglichen zu können.

In dieser Arbeit wird Vitamin D, auf welches im Folgenden detaillierter eingegangen wird, als potenzieller Immunmodulator betrachtet.

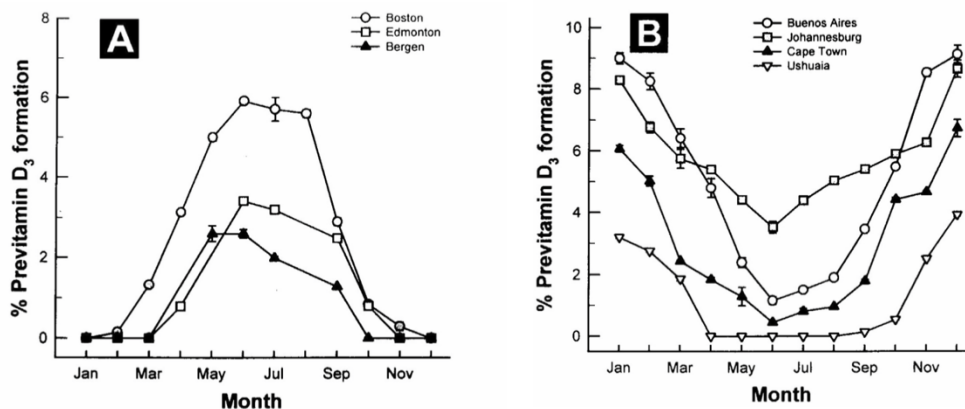
Vitamin D steht dem Menschen aus unterschiedlichen Quellen zur Verfügung. Den größten Anteil hat die körpereigene Vitamin-D-Synthese mit einer Umwandlung von 7-Dehydrocholesterol zu Prävitamin D3. Der Mensch kann Vitamin D ebenfalls aus Nahrungsmitteln wie Fisch (Lachs, Makrele, Sardinen, Lebertran) oder Pilzen gewinnen. Fisch liefert direkt Cholecalciferol (Vitamin D3), während Pilze Ergocalciferol (Vitamin D2) bereitstellen. Vitamin D3 kann von dem Körper wesentlich besser im Darm resorbiert werden als Vitamin D2 (Holick 2013; Prietl et al. 2013; Lamberg-Allardt 2006). Da überschüssiges Prävitamin D3 durch Sonnenlicht zerstört wird, kann es nicht zu einer UV-B-induzierten Hypervitaminose kommen (Holick 2013). Trotz der erheblichen Produktion von Vitamin D3 durch UV-B-Strahlung ist der Vitamin-D-Spiegel im Blut auch von der Ernährung abhängig, da es vor allem in den Staaten der nördlichen Hemisphäre wie z. B. Norwegen, Kanada, Finnland oder Schweden zu einer verminderten Sonnenlichtexposition, insbesondere in den



## 2. Einleitung

Wintermonaten, kommen kann. Die Jahreszeit hat wie man der unten stehenden Abbildung 2 entnehmen kann, entsprechend des jeweiligen Breitengrades erheblichen Einfluss auf den Vitamin-D-Spiegel im Blut (Prietl et al. 2013). Dies lässt sich aber nicht nur auf die durchschnittlichen Sonnenstunden in einem Land zurückführen, sondern auch auf Kleidungsstil, Lebensstil, Hautpigmentierung und genetische Determinanten. Dementsprechend gibt es von Land zu Land starke Unterschiede, was die Vitamin-D-Versorgung betrifft (Lamberg-Allardt 2006). In einigen Ländern wird Vitamin D aus diesem Grund in Nahrungsmitteln angereichert. In den USA und Kanada werden überwiegend Milchprodukte, Margarine und Müsli mit Vitamin-D<sub>2</sub>-Präparaten versetzt, wobei der Trend zum Vitamin D<sub>3</sub> geht (Wissenschaftlicher Ausschuss für Lebensmittel 2003).

Interessanterweise ähnelt diese saisonale Variation der ebenfalls in der wissenschaftlichen Literatur beschriebenen saisonalen Variation einiger Infektionskrankheiten, was die Frage aufwirft, inwieweit Vitamin D einen Einfluss auf das Immunsystem hat (White et al. 2009). Aktuelle Erkenntnisse zu dieser Frage werden in den nächsten Abschnitten näher erläutert.



**Abbildung 2:** Darstellung von der Vitamin-D-Produktion in Abhängigkeit von der Jahreszeit und der Lokalisation auf der Nord- (A) oder Südhalbkugel (B). Quelle: (Holick 2006)

### 2.2.2 Metabolismus des Vitamin D

Vitamin D wird im Körper mithilfe von Sonnenlicht (UV-B-Strahlung) gebildet. Ergosterol bzw. 7-Dehydrocholesterin oder auch Provitamin D<sub>3</sub> wird mithilfe von Sonnenlicht (Strahlung der Wellenlänge 290-315 nm) in der Haut in Cholecalciferol umgewandelt. Dieses wird nun in der Leber mithilfe der 25-Hydroxylase (CYP27A1) zu 25-Hydroxycholecalciferol hydroxyliert und gelangt dann in den Blutkreislauf, um in der Niere mithilfe der 1 $\alpha$ -Hydroxylase an der Position 1 zu 1,25-Dihydroxycholecalciferol hydroxyliert zu werden. 1,25-Dihydroxycholecalciferol stellt die aktive Form des Vitamin D dar.

## 2. Einleitung

---

Die Hauptwirkung des Vitamin D im Körper ist die Beeinflussung der Calciumhomöostase, an der die beiden Hormone Parathormon und Thyreocalcitonin entscheidend beteiligt sind. Vitamin D sorgt für eine Erhöhung des Plasmacalciumspiegels. Erreicht wird dies durch eine vermehrte intestinale Calciumresorption, eine gesteigerte renale Calciumabsorption und eine vermehrte Calciummobilisation aus dem Knochen durch eine vermehrte Aktivität der Osteoklasten. Zu den Hauptzielorganen zählen die Niere, der Knochen und der Darm. Zu den weiteren Wirkungen des Vitamin D gehört die Stimulierung der Differenzierung von Zellen des hämatopoetischen Systems, epidermaler Zellen und eine Modulation des Immunsystems. Der Wirkmechanismus von Vitamin D<sub>3</sub> beruht auf der Aktivierung der Transkription spezifischer Gene. Die aktive Form des Vitamin D, das 1,25-Dihydroxycholecalciferol bindet an den nukleären Vitamin-D-Rezeptor, der als Heterodimer mit dem Rezeptor für 9-cis-Retinsäure die entsprechenden responsiven Elemente in der DNA bindet (Löffler & Petrides 2013). Der Vitamin-D-Rezeptor wird direkt im Zielgewebe gebildet. Die weite Verbreitung des Rezeptors erklärt die multimodale physiologische Wirkung. So können über Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren über 2000 verschiedene Gene beeinflusst werden (Holick 2009; Rosen et al. 2012). Viele dieser Gene haben spezifische Vitamin-D-Reaktionselemente. Der Vitamin-D-Rezeptor (VDR) wirkt im Zusammenspiel mit anderen Rezeptoren, insbesondere dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR). VDR und RXR bilden zusammen ein Heterodimer, das seine Affinität zu den Promotern der Gene regulieren kann. RXR scheint dafür verantwortlich zu sein, VDR in Abwesenheit eines Liganden zu halten. Der VDR kann auch mit Schilddrüsenhormonrezeptoren oder Retinsäurerezeptoren komplexieren (Xie & Bikle 1997). Die Expression des Vitamin-D-Rezeptors in verschiedenen Immunzellen lässt zudem auf eine vielfältige Wirkung auf das Immunsystem schließen (Provvedini et al. 1983).

### 2.2.3 Definition des Vitamin-D-Status

Als bester Marker zur Darstellung der Vitamin-D-Versorgung des Menschen gilt das 25-Hydroxyvitamin D, da es sich hierbei um die Speicherform handelt, welche die mittel- und langfristige Versorgung im Körper sicherstellt. Bei dem Verdacht auf eine Stoffwechselerkrankung mit Störung der Vitamin-D-Synthese ist es ergänzend sinnvoll, das biologisch aktive, in der Niere verstoffwechselte 1,25-(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D<sub>3</sub> zu bestimmen. Die Bestimmung der Gesamtmenge (25-Hydroxyvitamin D und 1,25-(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D<sub>3</sub>) im Blut wird aufgrund der bedarfsabhängigen Synthetisierung nicht empfohlen (Holick 2007; Prietl et al. 2013; Heaney 2012).

## 2. Einleitung

---

Über die optimale Vitamin-D-Versorgung wird derzeit hingegen viel diskutiert. Viele Experten sind der Meinung, dass ein Vitamin-D-Spiegel unter 20 ng/ml (50 nmol/L) als unzureichend angesehen werden kann. Da sich der 25-Hydroxyvitamin-D-Spiegel bis zu einer Konzentration von 30-40 ng/ml umgekehrt proportional zur Hormonproduktion der Nebenschilddrüse verhält und sich die Schilddrüsenhormone an diesem Punkt ausgleichen, kann davon ausgegangen werden, dass ein Wert von 21-29 ng/ml eine relative Insuffizienz darstellt (Holick 2007). Unterstützt wird dies von der Erkenntnis, dass der Darm-Calcium-Austausch bei Frauen um 45 bis 60 % steigt, sobald die 25-Hydroxyvitamin-D-Werte auf 32 ng/ml angehoben werden (Heaney et al. 2003). Davon ausgehend kann ein Gehalt von 30 ng/ml oder mehr als ausreichend angesehen werden.

Auch bei der Supplementierung herrscht Uneinigkeit. Derzeit gibt es keinen internationalen Konsens. Die internationale endokrine Gesellschaft ist der Meinung, dass die tolerierbare Menge bei 10.000 IE/Tag liegt. Das Institut für Medizin (USA) setzt seine Empfehlung mit 4000 IE/Tag deutlich darunter an, während die Europäische Behörde für Lebensmittel dazu rät, unter 4000 IE/Tag zu bleiben (Battault et al. 2012; Heaney 2008). Die Verabreichung des hochreaktiven Metaboliten Calcitriol sollte wegen seiner potenziellen Nebenwirkungen zurückhaltend eingesetzt werden. Besondere Gefahr geht hierbei von einer Hyperkalzämie aus. Aktives Vitamin D wird daher selten eingesetzt. Indikationen wären zum Beispiel ein Hypoparathyreoidismus und ein Pseudohypoparathyreoidismus (Vieth 2007).

Ab einer Serumkonzentration von 150 ng/ml kann es zu einer Vitamin-D-Intoxikation mit Hyperkalzämie, Hyperkalziurie und Organverkalkungen kommen. Trotzdem werden verlängerte tägliche Einnahmen von 10.000 IE Cholecalciferol als sicher angesehen, da bestätigte Fälle von Vitamin-D-Intoxikationen meistens auf eine unbeabsichtigte Einnahme von mehr als 40.000 IE zurückzuführen waren (Vieth 2007; Zittermann et al. 2013; Lowe et al. 2011).

Studien zufolge haben ca. 1 Mrd. Menschen weltweit einen Vitamin-D-Mangel (Bischoff-Ferrari et al. 2009). Den Daten der Studie zur Gesundheit von Kindern und Jugendlichen in Deutschland (KiGGS) aus dem Bundesgesundheitsurvey von 1998 (BGS98) lässt sich entnehmen, dass von 10.015 Kindern im Alter von 1-17 Jahren 62 % der Jungen und 64 % der Mädchen unter einem Vitamin-D-Mangel laut Normwertvorgabe ( $< 50$  nmol/l) litten. Von 4.030 Erwachsenen im Alter von 18-79 Jahren litten 57 % der Männer und 56 % der Frauen unter einem Vitamin-D-Mangel (Robert-Koch-Institut 2012). Diese Werte sind wie bereits zuvor beschrieben jahreszeitabhängig.

## 2. Einleitung

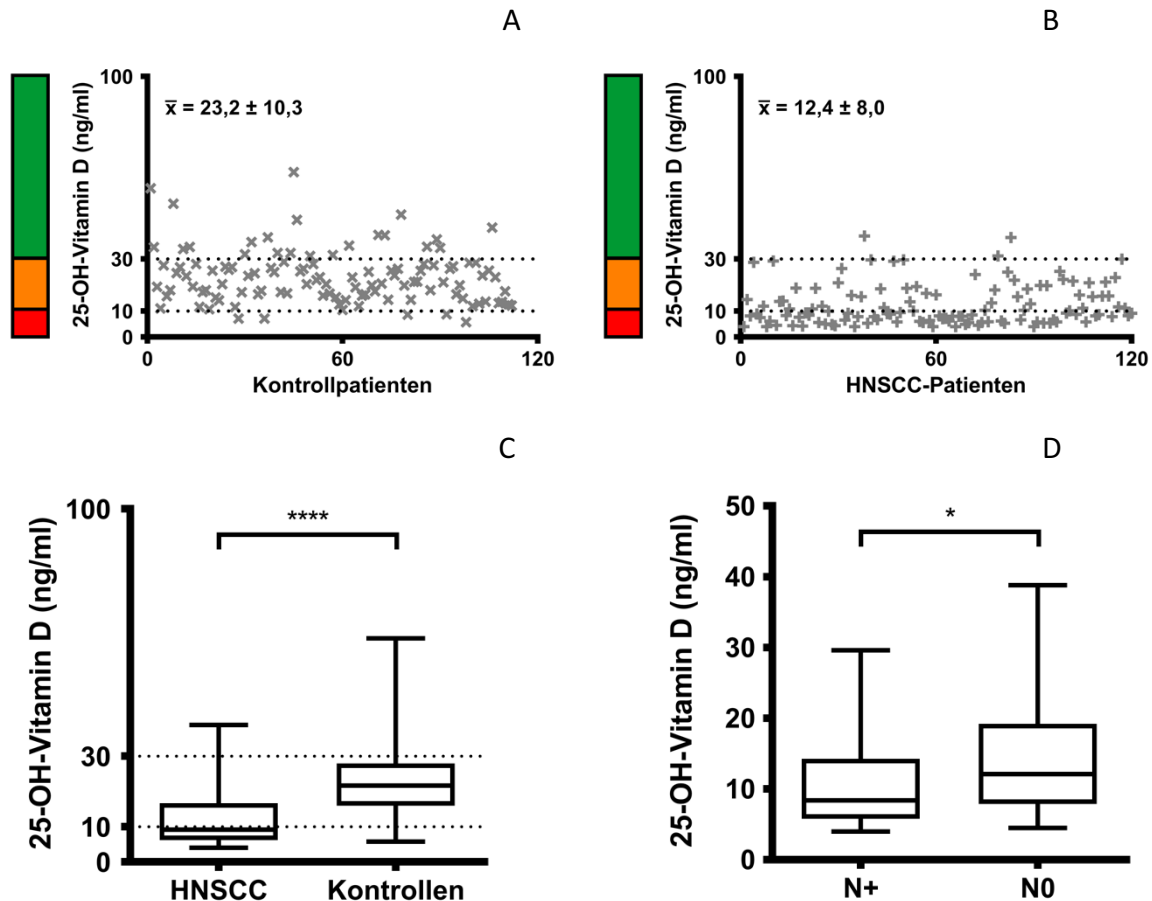
---

Ein ähnliches Bild zeigt sich auch bei der Betrachtung der Bevölkerung im Saarland. An der HNO-Klinik des Universitätsklinikums des Saarlandes haben Studien ergeben, dass Patienten, die an einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich leiden, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne Plattenepithelkarzinom einen sehr starken Vitamin-D-Mangel haben.

Hier lagen die Durchschnittswerte bei  $12,4 \text{ ng/ml} \pm 8,0$  (Abb. 3B) im Vergleich zu den Kontrollpatienten mit einem durchschnittlichen Vitamin-D-Serumgehalt von  $23,2 \text{ ng/ml} \pm 10,3$  (A). Dieser Unterschied kann auf verschiedene Faktoren bezogen werden. Zum einen ist das Patientenkollektiv mit einem Plattenepithelkarzinom trotz des erfolgten Alters- und Geschlechtsmatching nicht zu hundert Prozent mit der Kontrollgruppe vergleichbar, da viele Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich (HNSCC) rauchen und/oder Alkohol konsumieren, zum anderen haben Patienten mit einem fortgeschrittenen Tumor häufig nicht mehr dieselbe Sonnenlichtexpositionsdauer wie gesunde Probanden.

Dennoch muss man festhalten, dass zwischen den beiden Kollektiven ein erheblicher Unterschied in der Vitamin-D-Versorgung besteht (C). Deutlicher wird dies auch bei der Betrachtung der Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich unter der Berücksichtigung der Vitamin-D-Spiegel und dem Lymphknotenbefall (D). Hier fällt auf, dass Patienten, die einen höheren Vitamin-D-Spiegel hatten, signifikant weniger befallene Lymphknoten hatten und ein deutlich verbessertes Gesamtüberleben aufwiesen (persönliche Mitteilung Florian Bochen und Maximilian Linxweiler, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg).

Diese Ergebnisse stützen die Vermutung, dass Vitamin D einen entscheidenden Einfluss auf die Tumorabwehr haben könnte. Es stellt sich die Frage, an welchen Stellen Vitamin D Einfluss auf das Immunsystem hat und ob es nur das angeborene Immunsystem unterstützt oder auch das erworbene Immunsystem dazu verleitet, sich Pathogenen zur Wehr zu setzen.



**Abbildung 3:** In **A** sind die Vitamin-D-Serumspiegel der Kontrollpatienten dargestellt ( $\bar{x} = 23,2 \pm 10,3$ ) und in **B** die Vitamin-D-Serumspiegel der HNSCC-Patienten ( $\bar{x} = 12,4 \pm 8,0$ ). **C** veranschaulicht die in **A** und **B** für die beiden Gruppen dargestellten Daten mithilfe von Boxplots, statistische Signifikanz:  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*). **D** zeigt die Unterschiede im Lymphknotenbefall bei unterschiedlichem Vitamin-D-Serumspiegel, statistische Signifikanz:  $p = 0,0179$  (\*) (Persönliche Mitteilung: Florian Bochen, Forschungslabor der HNO des Uniklinikums des Saarlandes).

### 2.3 Einfluss von Vitamin D auf das Immunsystem

Wie verschiedene Studien festgestellt haben, hat Vitamin D einen großen Einfluss auf das Immunsystem (Priehl et al. 2013; Dörr et al. 2012; Bouillon et al. 2008; Zella et al. 2003; Nnoaham & Clarke 2008; Simpson et al. 2010; Kongsbak et al. 2014; Mora et al. 2008).

Aus diesem Grund wird im Folgenden zunächst ein allgemeiner Überblick über das Immunsystem und seine Möglichkeiten hinsichtlich der Tumorabwehr gegeben und dann die Auswirkungen des Vitamin D auf dieses näher erläutert.

#### 2.3.1 Vitamin D und das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist entwicklungsgeschichtlich älter als das erworbene Immunsystem und wird unabhängig von dem eindringenden Erreger aktiv.

## 2. Einleitung

---

Zu dem angeborenen Immunsystem gehören die Haut und die Schleimhäute als chemische und physische Barriere, das Komplementsystem, eine Reihe von unspezifischen Mediatoren wie Interleukine und Interferone und verschiedene Rezeptorproteine, die für die Erkennung von Mikroorganismen verantwortlich sind. Auf zellulärer Ebene sind Granulozyten, Makrophagen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) für die Erregerabwehr zuständig. Letztere bilden eine Schnittstelle zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem.

Um zwischen körpereigenen und pathogenen Stoffen unterscheiden zu können, besitzt das Immunsystem sogenannte Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRRs) und Toll-like-Rezeptoren (TLRs). Diese Rezeptorproteine sind in der Regel auf der zellulären Oberfläche, aber auch intrazellulär lokalisiert (W.-C. Liu et al. 2015).

Die Pattern-Recognition-Rezeptoren lassen sich in zwei Gruppen einteilen: die Pathogen associated molecular patterns (PAMPs, Pathogen-assoziierte molekulare Muster) und die Danger associated molecular patterns (DAMPs, Gefahren-assoziierte molekulare Muster). Toll-like-Rezeptoren (TLR) befinden sich in den Zellmembranen von dendritischen Zellen, Endothelzellen, Makrophagen und anderen Zellen. Die meisten TLR werden von Molekülen aktiviert, die für Prokaryonten typisch sind. Die Bindung des prokaryontischen Moleküls aktiviert die TLR-assoziierte Serin/Threonin-Kinase IRAK und führt schließlich zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB. Dieser ist sehr wichtig bei der Aktivierung und der Regulierung von Entzündungsvorgängen (W.-C. Liu et al. 2015; Bann et al. 2016).

Eine Verbindung dieses Mechanismus zu Vitamin D besteht dahingehend, dass PAMPs einen Toll-like-Rezeptor (TLR) aktivieren können, was zur Folge hat, dass die 1α-Hydroxylaseaktivität und die VDR-Rezeptorexpression hochreguliert wird, um 1,25(OH)D<sub>2</sub> zu produzieren. Ist der Serum-25(OH)D-Spiegel bei über 30 ng/ml kann es mithilfe der 1α-Hydroxylase zu aktivem Vitamin D umgewandelt werden (Wild 2010).

Dieses aktive Vitamin D kann nun in die Zelle eindringen und unter Komplexbindung mit einem Retinoid-X-Rezeptors (RXR) eine Bindung mit dem VDR eingehen und so das Signal zur Bildung von Cathelicidin und beta Defensin 2 geben (Prufer et al. 2000; Reichrath et al. 2016; P. T. Liu et al. 2009).

Cathelicidin ist ein antimikrobakterielles Protein, das in Lysosomen, Makrophagen und Leukozyten gefunden wird. Es unterstützt das Immunsystem, indem es für die Schädigung von mikrobiellen Membranen verantwortlich ist. Passend dazu hatten in Studien Patienten mit

## 2. Einleitung

---

einer chronischen Nierenerkrankung und gleichzeitigem Vitamin-D-Mangel erhöhte Mortalitätsraten aufgrund von schweren Infektionen (P. T. Liu et al. 2009).

Eine Studie von Afroamerikanern mit einem niedrigen Vitamin-D-Spiegel hat zudem gezeigt, dass es nach ausreichender Bereitstellung von Vitamin D zu einer verstärkten TLR-Aktivierung und einer vermehrten Bildung von Cathelicidin-mRNA kommt (P. T. Liu et al. 2006). Außerdem konnte gezeigt werden, dass verminderte Cathelicidin-Spiegel die Monozytenkapazität für die Tötung von *M. tuberculosis* verringern und erhöhte Vitamin-D-Spiegel den Cathelicidin-Spiegel steigern (P. T. Liu et al. 2006).

Vitamin D kann durch die Bindung an den VDR die Expression des beta Defensins-4A-(DEFB4A)-Gens, das für das antibakterielle beta-Defensin-2-Protein kodiert eine Immunantwort steigern. Darüber hinaus wird DEFB4 durch Calcitriol, (1,25(OH)D<sub>2</sub>) durch Nukleotid-bindende Oligomerisierungsdomäne 2 (NOD2) induziert, ein intrazelluläres PRR, das Muramylpeptid (MDP), ein Zellmembranprodukt von Bakterien, bindet (Hewison 2011).

Weiterhin wurde festgestellt, dass ein erhöhter Cathelicidinspiegel die Aktivität von NOD2/Card15-beta-Defensin 2, autophagiebezogenes Protein 5(ATG5) und BECLIN1 steigert. Diese Proteine sind für eine verstärkte Autophagie verantwortlich (Klionsky 2000).

Die Autophagie stellt einen Schlüsselfaktor für die Abwehr von mikrobakteriellen Pathogenen aufgrund ihrer Beteiligung bei der Zerstörung von geschädigten zytosolischen Komponenten und fehlgefalteten Proteinen dar (Yuk et al. 2009). Wichtig ist hierbei auch die Erkennung von unreifen Phagosomen (Gutierrez et al. 2004).

Vor diesem Hintergrund lassen sich auch die Ergebnisse von Studien interpretieren, die gezeigt haben, dass ein hoher Vitamin-D-Serumgehalt bei der Bekämpfung von *M. tuberculosis* nützlich sein kann (Nnoaham & Clarke 2008; Prietl et al. 2013).

Eine weitere wichtige Komponente des unspezifischen Immunsystems ist das Komplementsystem. Es besteht aus ca. 30 Glykoproteinen, die in der Leber hergestellt und im Anschluss ins Blut ausgeschüttet werden. Die Abwehr von Infektionserregern erfolgt dabei teilweise durch eine Interaktion der Komplementfaktoren mit Antikörpern und teilweise ohne eine solche Interaktion. Das Komplementsystem kann auf drei verschiedene Arten aktiviert werden. Auf dem klassischen Weg, dem alternativen Weg und dem Lektinweg.

Der klassische Weg ist antikörperabhängig. Als Erstes bindet die Untereinheit C1q des Komplementproteins C1 an einen antigengebundenen IgM- oder IgG-Antikörper. Es folgt die

## 2. Einleitung

---

Bindung und Aktivierung der Komplementproteine C2-C5. C5 wird daraufhin in die Fragmente C5a und C5b gespalten. C5b bildet nun mit den Fragmenten C6-C9 einen sogenannten Membrane Attack Complex (MAC). Dieser bildet in der Ziellmembran eine Pore, was die Lyse des Mikroorganismus zur Folge hat.

Der alternative Weg ist antikörperunabhängig. Auslöser der Reaktionskaskade ist die kovalente Bindung von C3b an einen Mikroorganismus bzw. einen Fremdkörper. Es folgt entweder eine Porenbildung oder die Phagozytose. Die Porenbildung erfolgt ähnlich wie beim klassischen Weg über C3b, welches C5 aktiviert und so einen MAC bildet. Dies führt zur Lyse. Die Phagozytose erfolgt durch die Bindung eines antigegebundenen C3b, welches wiederum von einem Komplementrezeptor CR1 gebunden wird. Es kommt so zu einer Markierung des Pathogens, welches im nächsten Schritt phagozytiert wird.

Der Lektinweg wird aktiviert über das Mannose bindende Lektin (MBL), welches an mannosereiche bakterielle Polysaccharide bindet, Antikörper aktiviert und so den klassischen Weg der Komplementaktivierung auslöst (Hof & Dörries 2017), (Löffler & Petrides 2013; Rassow et al. 2016).

### 2.3.2 Vitamin D und das adaptive Immunsystem

Im Gegensatz zu dem angeborenen Immunsystem ist das adaptive oder erworbene Immunsystem nur bei Wirbeltieren vorhanden. Es beruht auf der Fähigkeit, Antikörper oder ein spezifisches Bindeprotein für nahezu alle pathogenen Strukturen bilden zu können. Es ist in der Lage,  $10^{11}$  verschiedene Antikörper zu bilden. Diese Vielfalt ist mithilfe von somatischer Rekombination der Gensegmente während der Reifung in den B-Zellen möglich (Löffler & Petrides 2013; Rassow et al. 2016; Hof & Dörries 2017).

Die adaptive Immunabwehr beruht im Wesentlichen auf der Funktion der B-Lymphozyten und T-Lymphozyten. Nach der Exposition mit einem Pathogen nimmt die Herstellung von Abwehrmechanismen einige Tage in Anspruch. Nach dieser Zeit haben sich in der Regel Gedächtniszellen gebildet, welche längere Zeit erhalten bleiben und so eine Immunantwort bei erneuter Exposition schneller triggern können. Die menschlichen Antikörper lassen sich in fünf Klassen einteilen: IgA, IgG, IgE, IgD und IgM. Antikörper bestehen aus globulären Proteinen mit einer beta-Faltblattstruktur, welche in Form von kurzen L-Ketten (Light Chains) und langen H-Ketten (Heavy Chains) über Disulfidbrücken verbunden sind. Ein Antikörpermolekül enthält mindestens zwei identische H- und zwei identische L-Ketten. Mithilfe von variablen Domänen ist es möglich, Antigene zu binden. Mit 75 % der Antikörper im Blut stellt IgG den größten Anteil im Blut dar, während IgA der meistproduzierte



## 2. Einleitung

---

Antikörper insgesamt ist und sowohl in Schleimhäuten als auch in Speichel, Tränen und Muttermilch sezerniert wird.

IgG ist vorwiegend für die Neutralisierung von Bakterien, bakteriellen Toxinen und Viren sowie für die Opsonierung und die Aktivierung von Komplementfaktoren verantwortlich, während IgA nur der Neutralisierung und der Opsonierung dient.

IgM-Monomere sind die ersten Immunglobuline, die nach Antigenkontakt von reifenden B-Zellen auf der Zelloberfläche exponiert werden. Sie sind ähnlich wie IgG und IgA aufgebaut, haben aber keine Scharnierregion und sind als Pentamer angeordnet. Sie dienen mit ihrer hohen Avidität und Effizienz aufgrund ihrer zehn Bindungsstellen der Antigenerkennung und -immobilisation.

IgD-Antikörper werden nur in sehr geringer Menge sezerniert, erscheinen aber regelmäßig in frühen B-Zell-Entwicklungsstadien als B-Zell-Rezeptoren auf der Oberfläche. IgE liegt im Serum auch in sehr geringer Konzentration vor und dient in erster Linie der Abwehr von Parasiten. IgE ist an der Auslösung von Allergien beteiligt und aktiviert das Komplementsystem nicht.

### 2.3.2.1 Zelluläre Grundlagen der adaptiven Immunantwort

Kommt es zur Exposition des Organismus mit einem Pathogen, wird dieses in der Regel von einer dendritischen Zelle (DC) phagozytiert. Hierbei sind auch Scavenger-Rezeptoren und Toll-like-Rezeptoren von Bedeutung.

Die dendritische Zelle, die in Antigenkontakt gekommen ist, verlässt nun das Gewebe und gelangt über die Lymphflüssigkeit in regionale Lymphknoten, um sich dort als interdigitierende dendritische Zelle festzusetzen.

Dendritische Zellen sind antigenpräsentierende Zellen (APC). Das bedeutet, dass die aufgenommenen Erreger in den Lysosomen abgebaut und in Peptidfragmente gespalten werden. Diese Peptidfragmente werden nun mithilfe von MHC-II-Proteinen an der Zelloberfläche T-Zellen präsentiert.

MHC-Proteine dienen der Präsentation von Peptidfragmenten, die nach dem proteolytischen Abbau von Antigenen entstehen. Man unterscheidet dabei in MHC-I- und MHC-II-Proteine. MHC-I-Proteine sind auf allen kernhaltigen Zellen vorhanden, während MHC-II-Moleküle nur bei Phagozyten und B-Lymphozyten exprimiert werden.

Antigene, die ohne Beteiligung von dendritischen Zellen in Lymphknoten auftauchen, werden mithilfe von im äußeren Cortexbereich positionierten follikulären dendritischen Zellen phagozytiert und exponiert. Mit der Lymphflüssigkeit durch den Lymphknoten transportierte B- und T-Lymphozyten tasten die dendritischen Zellen ab. Dabei liegt der Fokus der T-Zellen auf den interdigitierenden dendritischen Zellen und der Fokus der B-Zellen auf den follikulären dendritischen Zellen.

B-Zellen, die an den follikulären DC ein passendes Antigen finden, nehmen es auf, prozessieren es und exponieren es an ihrer Oberfläche mithilfe von MHC-II-Proteinen. B-Zellen gehören somit auch zu den antigenpräsentierenden Zellen. T-Zellen, die ein passendes Antigen finden, werden festgehalten und aktiviert. Aktivierte T-Zellen werden zur Zellteilung angeregt. Die Tochterzellen differenzieren sich entweder zu TH1- oder TH2-Zellen.

B-Zellen, die ein Antigen aufgenommen haben, treffen nun in der T-Zell-Zone auf die Effektor-T-Zelle. Dadurch wird die B-Zelle aktiviert und bildet Antikörper.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass dendritische Zellen Zielzellen von Vitamin D sind. Während der DC-Differenzierung regulieren diese APCs den monozytischen Marker CD14, während der DC-Marker CD1a hochreguliert wird. Die Zugabe von 1,25 (OH) 2D3 inhibiert die Differenzierung von CD1a + DCs vollständig, während die Expression von monozytischen Markern aufrechterhalten wird (Pedersen et al. 2009; Baeke, Takiishi, et al. 2010). Darüber hinaus hemmt die Aktivierung von VDR-Signalwegen auch die DC-Reifung, wie durch verminderte Niveaus von DC-Markern, MHC-Klasse II, kostimulatorischen Molekülen (CD40, CD80 und CD86) und anderen reifungsinduzierten Oberflächenmarkern (z. B. CD83). Zudem moduliert Vitamin D die von den dendritischen Zellen ausgehende Cytokin- und Chemokin-Expression durch die Hemmung der Expression von IL-12 und IL-23. Diese Zytokine sind für die Differenzierung von TH2- und TH17-Zellen verantwortlich. Zusätzlich sorgt es für die vermehrte Freisetzung von IL-10, welches eine große Rolle bei der Entzündungshemmung spielt und dem Chemokin MIP-3a (auch bekannt als CCL22), ein Chemokin, das an der Rekrutierung von CCR4-exprimierenden regulatorischen T-Zellen (Tregs) beteiligt ist (van Halteren et al. 2002; Gauzzi et al. 2005; Pedersen et al. 2009; Piemonti et al. 2000; Baeke, Takiishi, et al. 2010).

### 2.3.2.1.1 B-Zellen

B-Zellen werden zum größten Teil im Knochenmark aus lymphatischen Stammzellen hergestellt. Die B-Zelle produziert zunächst Antikörper, die in der Plasmamembran verankert werden. Diese membrangebundenen Antikörper werden B-Zell-Rezeptoren genannt und

stellen die Antikörper dar, die von der B-Zelle gebildet werden können. In frühen Stadien der Entwicklung handelt es sich hierbei um IgM- oder IgA-Moleküle, später sind es in erster Linie IgG-Antikörper.

B-Zellen, die Antikörper produzieren, die gegen körpereigene Strukturen gerichtet sind, werden durch Apoptose vernichtet. Nur B-Zellen, die nicht aussortiert werden, siedeln sich in den sekundären lymphatischen Organen an.

Erste Studien aus dem Jahr 1984 haben gezeigt, dass Calcitriol eine Hemmung der Differenzierung, Proliferation, Einleitung der Apoptose und verminderter Immunglobulinproduktion indirekt über T-Helfer-Zellen vermittelt (Lemire et al. 1984). Neuere Studien konnten zusätzlich direkte Effekte auf die B-Zell-Homöostase zeigen, wobei im Wesentlichen die Einleitung der Apoptose von immunglobulinproduzierenden B-Zellen sowie eine Hemmung der Speicher- und Plasmazellerzeugung beeinflusst werden können (S et al. 2007).

### 2.3.2.1.23 T-Zellen

T-Zellen verlassen das Knochenmark im Gegensatz zu den B-Zellen schon in einem frühen Stadium. Die Reifung wird im Thymus abgeschlossen. Im Thymusstroma wird durch Rekombination bestimmter Gensegmente die Expression von alpha- und beta-Ketten induziert, die den T-Zellrezeptor bilden. Zusätzlich werden die Membranproteine CD4 und CD8 exprimiert. CD4 dient der Bindung an MHC-II-Proteine, während CD8 die Bindung an MHC-I-Proteine erlaubt. Ähnlich wie die B-Zellen unterliegen auch die T-Zellen einer Selektion. Nur T-Zellen, die an ein MHC-I- oder -II-Protein binden, welche von den kortikalen Epithelzellen angeboten werden, können den Thymus verlassen. Auch die T-Zellen können durch Vitamin D beeinflusst werden. Prinzipiell konnten diesbezüglich in Studien drei verschiedene Mechanismen identifiziert werden: Zum einen direkte endokrine Effekte, die von systemischem Calcitriol auf die T-Zellen eine Wirkung haben, die Umwandlung von 25 (OH) D zu Calcitriol durch T-Zellen und die damit verbundenen Effekte auf die T-Zellen sowie eine indirekte Beeinflussung durch eine veränderte Antigenpräsentation der lokalen APCs (Prietl et al. 2013). Grundsätzlich wird Vitamin D in verschiedenen Studien eine immunsuppressive Wirkung hinsichtlich der zellulären Immunität zugeschrieben (Prietl et al. 2013; Baeke, Takiishi, et al. 2010; Baeke, Korf, et al. 2010).

Das bedeutet, dass eine Vitamin-D-Exposition zu einer Verschiebung von einer proinflammatorischen zu einem toleranteren Immunstatus führt. Hier kann man beobachten, dass T-Zellen unter Vitamin-D-Einfluss die Sekretion von Interleukin-2, Interferon-Gamma (IFN $\gamma$ ), Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF $\alpha$ ) und Interleukin 9 reduzieren. Die Produktion

## 2. Einleitung

---

von entzündungshemmenden Zytokinen wird hingegen gefördert (IL-3, IL-4, IL-5, IL-10) (Boonstra et al. 2001). Die Studie von Baeke et al. hat zudem im Tiermodell (Maus) gezeigt, dass es unter Vitamin-D-Einfluss zu einer Suppression der T-Zellproliferationskapazität kommt, es aber gleichzeitig eine Aktivierung von CD4<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen eintritt, welche die funktionelle Fähigkeit aufwiesen, Effektor-T-Zellen zu regulieren (Baeke, Korf, et al. 2010). IL17, das von Th17-Zellen produziert wird, wird ebenfalls von Vitamin D reguliert. Die Hemmung der Th17-Aktivität scheint eine wichtige Rolle bei der Behandlung von Autoimmunkrankheiten zu spielen, wie bei nicht-fettleibigen diabetischen (NOD) Mäusen gezeigt wurde. Es wurde festgestellt, dass Calcitriol die IL17-Produktion auf einer Transkriptionsstufe direkt unterdrückt und aktivierte menschliche T-Zellen, die Calcitriol ausgesetzt waren, signifikant verringerte Niveaus von IL17, Interferon- $\gamma$  und IL21 aufwiesen. Die gleiche Studie zeigte auch eine Veränderung zu einem toleranteren Phänotyp, einschließlich einer erhöhten Expression von Genen, die für regulatorische T-Zellen (Tregs) typisch sind (Baeke, Takiishi, et al. 2010; Prietl et al. 2013). Tregs unterdrücken eine proinflammatorische Reaktion anderer Immunzellen und verhindern so übertriebene oder autoimmune Phänomene. Sie werden über antigenpräsentierende Zellen stimuliert, welche über Vitamin D aktiviert wurden, und werden somit indirekt von Vitamin D beeinflusst. Die bisher durchgeführten Studien zu Vitamin D beziehen sich in erster Linie auf aktives Calcitriol oder Analoga. Die Auswirkung von nativem Vitamin D auf die unterschiedlichen T-Zell-Subtypen sind noch nicht hinlänglich untersucht worden. In Pilotstudien konnte aber gezeigt werden, dass Patienten, welche hohe Vitamin-D-Spiegel supplementiert bekommen haben, im Vergleich zu der Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung von Tregs im peripheren Blut hatten (Baeke, Takiishi, et al. 2010; Chen et al. 2007).

Es stellt sich nun die Frage, inwieweit Vitamin D das Immunsystem auch bei anderen Aufgaben unterstützen kann. Gerade in der Tumorforschung liegt der Fokus aktuell sehr stark auf Immuntherapien. Hierbei soll das körpereigene Immunsystem genutzt werden, um den Tumor effektiv zu bekämpfen. Zum Beispiel hat eine adaptive T-Zell-Therapie bei Patienten mit einer weit fortgeschrittenen malignen Erkrankung starke Remissionen hervorgerufen (Prietl et al. 2013; Kansy et al. 2015).

Darüber hinaus wurden therapeutische monoklonale Antikörper entwickelt, um die durch T-Zellen vermittelten inhibitorischen Signale durch das zytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Antigen CTLA-4 zu hemmen (Baeke, Korf, et al. 2010; Bann et al. 2016). Nicht alle Tumoren reagieren aber auf dieselbe Therapie, was die Heterogenität von Krebs deutlich

macht. Die große Herausforderung ist es, das jeweilige molekulare Profil eines Tumors zu entschlüsseln, um so eine spezifische Therapie zu ermöglichen. Ein wichtiger Bestandteil dieses individualisierten therapeutischen Ansatzes ist es, das Immunsystem zu nutzen, um aktiv eine bösartige Veränderung erkennen und eliminieren zu können. Diese Prämisse wurde ursprünglich von Thomas und Burnet im Jahre 1957 in der Immunosurveillance-Hypothese vorgeschlagen, die eine Rolle für das Immunsystem bei der Kontrolle der Entwicklung von transformierten Zellen postulierte (Burnet 1970).

Diese Hypothese wurde in den letzten Jahren dahingehend erweitert, dass man mittlerweile davon ausgeht, dass Tumorzellen mit einer niedrigen Antigenexpression oder verminderter Immunogenität selektiert wurden. Dieser Prozess wird als „Krebs-Immunoediting“ bezeichnet. Dabei werden einzelne Krebsklone selektiert, die effektiv einer immunvermittelten Eliminierung durch Leukozyten entgehen können. Einige Tumoren können sich der Immunantwort auch durch die Rekrutierung von immunsuppressiven T-Zellen entziehen. Immunsignaturen für die Krebsimmuntherapie werden aktiv in vielen klinischen Studien untersucht. Im Gegensatz zu kleinen Molekül-Inhibitoren, bei denen die Anwesenheit oder Abwesenheit einer Zielmutation eine Antwort vorhersagen kann, beruht die Wirksamkeit der Immuntherapie auf der funktionalen Kompetenz mehrerer immunologischer Elemente.

### 2.4 Eigene Fragestellung

In der Vergangenheit lag der Schwerpunkt der Kopf-Hals-Tumorthherapie auf Kombinationen und Sequenzen von Chemotherapie, Strahlentherapie und Chirurgie. Aufgrund der langfristigen Toxizität wurde die FDA-Zulassung für Chemotherapeutika eingeschränkt. Als erster therapeutischer Antikörper wurde der Anti-EGFR-Antikörper Cetuximab im Jahr 2006 zur Therapie von Kopf-Hals-Tumoren zugelassen. Die Überlebensdaten der Patienten haben sich aber trotz dieser Neuerungen und Verbesserungen in der Strahlen- und Chemotherapie nicht wesentlich verbessert. Es kam sogar noch zu einer Zunahme der Toxizität (Schmoll et al. 2013).

Um den Patienten ein besseres Überleben zu ermöglichen, muss daher verstärkt nach neuen Ansätzen gesucht werden, um die Prognose zu verbessern, Rezidiven vorzubeugen und Nebenwirkungen zu reduzieren.

Als möglicher Ansatz könnte die Immunmodulation genutzt werden, um das Immunsystem zu aktivieren und gegen den Tumor zu richten. Ein wesentliches Problem stellt hierbei aber die in der Regel sehr stark ausgeprägte Immunschwäche von Kopf-Hals-Tumorpatienten dar.

## 2. Einleitung

---

Lymphknoten von Kopf-Hals-Tumorpatienten haben zum Beispiel einen deutlich verminderten T-Zell-Gehalt. Hinzu kommt, dass etwa ein Drittel der T-Zellen in Lymphknoten von HNSCC-Patienten nicht auf eine Stimulation des CD3-Rezeptors reagieren und es Defekte in der Reifung von dendritischen Zellen gibt. Insgesamt hat die Immundepression zur Folge, dass das klinische Gesamtüberleben reduziert ist. Die Immundepression bei HNSCC-Patienten wird nicht nur durch immunsuppressive Mediatoren verursacht, die von den HNSCC-Zellen produziert werden, sondern auch die immunsuppressiven Zellen, die sie induzieren. Zuletzt wurde festgestellt, dass M2-Makrophagen und CD34+-Zellen zu einer Immundysfunktion in dieser Patientenpopulation beitragen (Russell et al. 2011; Wild 2010; Bergmann et al. 2008; Strauss et al. 2007; Tsujikawa et al. 2012).

Wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben, hat Vitamin D eine teils schon detailliert beschriebene, aber auch eine teils nach wie vor ungeklärte Wirkung auf das Immunsystem. Für die Entwicklung neuer immunmodulatorischer Therapiestrategien ist es daher erforderlich, zu erforschen, wie sich Vitamin D auf die tumorspezifische Immunabwehr auswirkt. Hierzu gibt es erste Mausmodell-Untersuchungen, die gezeigt haben, dass eine Vitamin-D-Therapie das Ausmaß der Metastasierung von Lewis-Lungenkarzinomen reduzieren kann (Wiers et al. 2000).

Bei Hamstern konnte mit einer Vitamin-D-Therapie eine klinische Wirksamkeit bei der Behandlung von bukkalen Beuteltumoren nachgewiesen werden (Bothwell et al. 2015; Young & Day 2013). Auch bei Brustkrebspatientinnen konnte nachgewiesen werden, dass eine Vitamin-D-Supplementierung einen positiven Effekt auf das Überleben hat. Während der Mechanismus, mit dem Vitamin D seine Anti-Tumor-Effekte ausübt, nicht vollständig aufgeklärt wurde, ist klar, dass Vitamin-D-Metaboliten aktive immunregulatorische Eigenschaften besitzen, obwohl diese Eigenschaften paradox sind. Zum Beispiel unterdrückt Vitamin D die entzündlichen Wirkungen der TH1-Zellen in der Lungentuberkulose, aber gleichzeitig fördert es die makrophagenassoziierte bakterizide Aktivität (Cantorna 2010; Adams & Hewison 2010).

Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, inwieweit Vitamin D auch auf Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich einen Einfluss hat.

## 2. Einleitung

---

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, inwieweit die Leukozyteninfiltration von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich abhängig vom Vitamin-D-Serumspiegel der Patienten ist.

Dazu wurde ein Kollektiv von 103 HNSCC-Patienten ausgewählt, von denen 44 Patienten einen Vitamin-D-Serumspiegel unter 10 ng/ml hatten und 59 Patienten einen Vitamin-D-Serumspiegel von über 15 ng/ml aufweisen konnten. Um dabei verschiedene Immunzellpopulationen differenzieren zu können, wurden mehrere Antikörper für entsprechende immunhistochemische Färbungen des Tumorgewebes verwendet. Hierbei repräsentieren die CD4-positiv gefärbten Zellen in erster Linie die T-Helferzellen und die CD8-positiv gefärbten Zellen zum Großteil die zytotoxischen T-Zellen. Die beiden Antikörper stehen für die Lymphozytenpopulation.

Um die Makrophagen nachzuweisen, wurde ein CD11c-Antikörper eingesetzt, der vornehmlich M1-Makrophagen darstellt, ein CD68-Antikörper, der als Panmakrophagenmarker dient, und ein CD163-Antikörper, der die M2-Makrophagenpopulation darstellt.

Alle Antikörper wurden, wie im Material- und Methodenteil beschrieben, genutzt, um mithilfe eines im Vorfeld etablierten Protokolls immunhistochemisch die Immunzellinfiltration der Tumoren zu untersuchen.

## 3. Material/Methoden

### 3.1 Material und Herstellernachweis

#### 3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Abimed, Düsseldorf	Gilson-Pipetten
B. Braun, Melsungen	Aqua
Carl Zeiss AG, Oberkochen	Durchlichtmikroskop, 4316184
Dako GmbH, Glostrup, Dänemark	REAL™DetectionSystemAlkalinePhosphatase/RED
Eppendorf, Hamburg	Tischzentrifuge (Centrifuge 5415)
Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig	SuperFrost Objektträger
IKA, Staufen	Magnetrührer Combimag RCT
Integra Biosciences, Biebertal	Pipetboy acu
Leica Microsystems, Wetzlar	Rotationsmikrotom SM2400; Rotationsmikrotom RM2125RT
MMM, Medcenter Einrichtungen GmbH, Planegg	Wärmeschrank, Incucell
Medax Nagel GmbH, Kiel	Wasserbad, Medax Typ WB24
Merck, Darmstadt	Entellan, Art. 1.07961.0500
Panasonic, Hamburg	Mikrowelle, Dimension 4
R. Langenbrick, Emmendingen	Deckgläser
R. Langenbrick, Emmendingen	Objektträger
Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen	Reagens-Transfer-Prozessor, Tissue-Tek®VIP™5 Jr
Sarstedt, Nümbrecht	Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße (1,5ml, 2ml),
Sartorius, Göttingen	Feinwaagen BP 61, BP 4100
Schleicher und Schüll, Dassel	Filterpapier, DE81
Scientific Industries, Bohemie N.Y., USA	Vortex-Mixer (Genie2™)
Tefal S.A.S, Rumilly, Frankreich	RK1101 Reiskocher
Thermo Shadon GmbH, Frankfurt a.M.	Einbettungsgerät, Histocentre2
WTW, Weilheim	pH-Meter, pH 197



### 3. Material/Methoden

#### 3.1.2 Lösungen und Puffer

<b>Lösungen und Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
0,5 M EDTA-Lösung; pH 8,0	93,06 g EDTA 300 ml Aqua dest
1 M Tris-Lösung	12,11 g Tris-Base 100 ml Aqua dest
Tris-EDTA Retrivalpuffer; pH 9,0	296,4 ml Aqua dest 3,0 ml 1 M Tris-Lösung 600 µl 0,5 M EDTA-Lösung
PBS, pH 7,4, Thermo Fisher Scientific	Ready-to-use Lösung
3 % BSA in PBS	190 ml PBS 6 g BSA
1 % BSA in PBS	195 ml PBS 2 g BSA

#### 3.1.3 Chemikalien

Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, Art. A9418
Ethanol, 100 %	Merck, Art. 8187601000
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, Art. MHS32-1L
Trizma® Base	Sigma, Art. 061M5400V
Xylol	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Art. 09208831

#### 3.1.4 Verwendete Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Verdünnung</b>
Anti CD4	Monoklonaler Peptidantikörper	Maus; Abcam, England; Art. ab846	1:40 (IHC)
Anti CD8	Polyklonaler Peptidantikörper	Kaninchen; Abcam, England; Art. Ab4055	1:800 (IHC)
Anti CD11c	Monoklonaler Peptidantikörper	Kaninchen; Abcam, England; Art. Ab52632	1:100 (IHC)
Anti CD68	Monoklonaler Peptidantikörper	Maus; Abcam, England; Art. Ab955	1:200 (IHC)
Anti CD163	Polyklonaler Peptidantikörper	Kaninchen; Abcam, England; Art. Ab87099	1:16000 (IHC)

#### 3.2 Fixierung des Gewebes

Nach der Entnahme des Primärtumors oder der Lymphknotenmetastasen wurden die Gewebeproben in einem PBS-gepufferten, 4%igen-Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet.

Der Reagenz-Transferprozess fand, wie in Tabelle 4 beschrieben, mithilfe des Tissue-Tek®VIP™5 JR automatisiert statt.

**Tabelle 4:** Systematische Darstellung des Reagenz-Transferprozesses zur Gewebefixierung

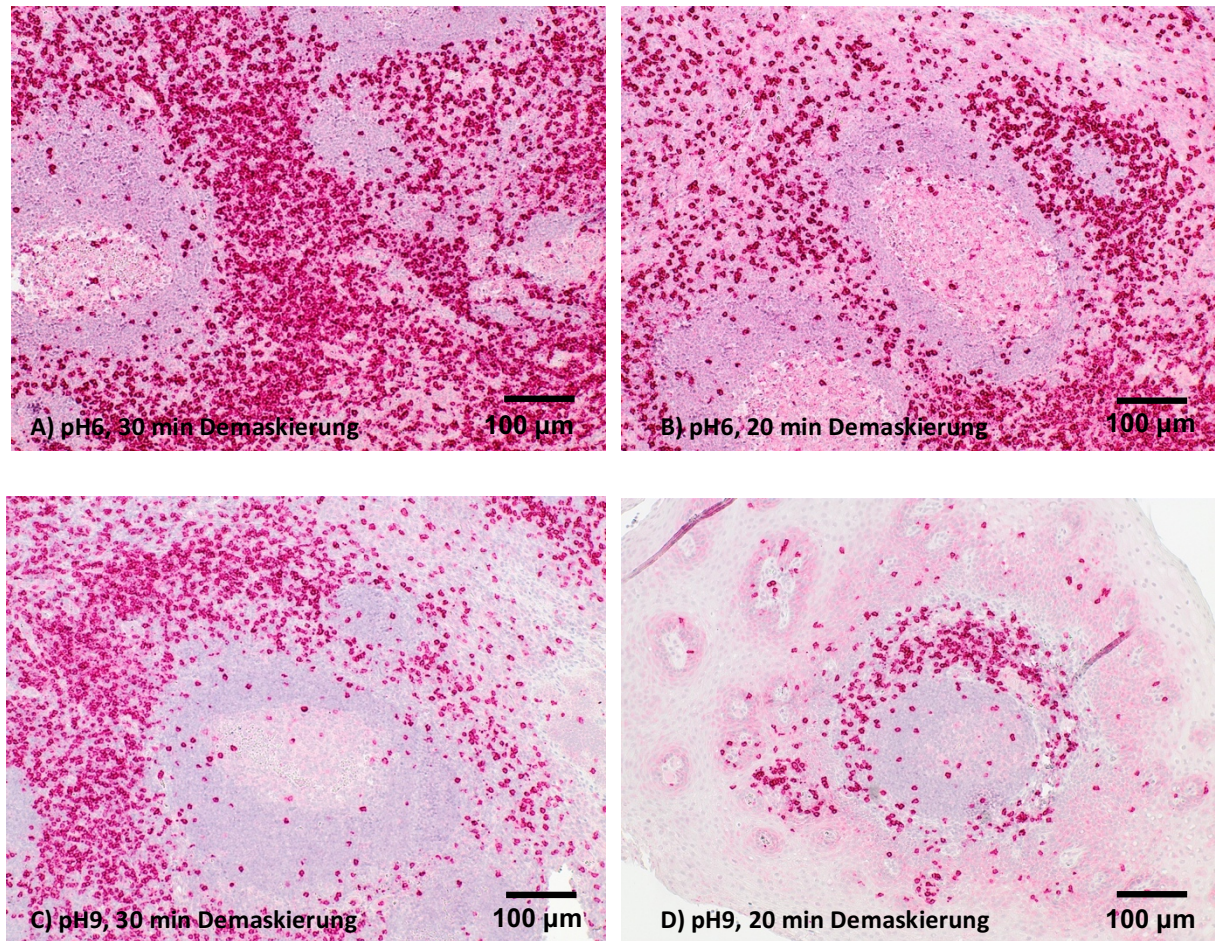
Reagenz	Dauer (h)	Temperatur (C°)
4%iges Formalin/1xPBS	2,0	45
70%iges Ethanol	0,5	40
70%iges Ethanol	1,0	40
70%iges Ethanol	1,0	40
96%iges Ethanol	0,5	40
99%iges Ethanol	1,0	40
99%iges Ethanol	1,0	40
Xylol	1,0	40
Xylol	1,0	40
Xylol	1,0	40
Paraffin	0,5	60
Paraffin	0,5	60
Paraffin	1,0	60
Paraffin	1,0	60

#### 3.3 Immunhistologische Färbungen

##### 3.3.1 Etablierung

Die histologischen Präparate der 103 Patienten wurden alle mithilfe einer immunhistochemischen Färbung von entsprechenden FFPE-Gewebeschnitten angefertigt. Dazu wurde ein Protokoll von Dr. rer. nat. Florian Bochen (Forschungslabor der HNO-Klinik, Universität des Saarlandes) verwendet, welches im Vorfeld an die Präparate angepasst wurde. Durch diesen Schritt konnten spezifische Färbungen garantiert werden.

Im ersten Schritt wurden Tonsillen und Lymphknoten als Etablierungsmaterial verwendet, um zum einen kein Patientenmaterial zu verschwenden, und zum anderen eine möglichst große Zahl verschiedener Immunzellpopulationen darstellen zu können, und mit den oben beschriebenen Antikörpern gefärbt. Danach wurde Tumormaterial von Patienten mit einem HNSCC verwendet, welche aber nicht Bestandteil des Kollektivs waren. Dieser Schritt wurde durchgeführt, um ein noch besseres Ergebnis bei der Übertragung des Protokolls von Etablierungsmaterial auf Patientenkollektivmaterial zu erhalten.



**Abbildung 4:** Darstellung der Etablierung mit unterschiedlichen pH-Werten und Demaskierungszeiten: Die Bilder **A** und **B** zeigen Versuche mit einem Demaskierungspuffer mit dem pH 6 und unterschiedlichen Demaskierungszeiten, die Bilder **C** und **D** stellen Versuche mit einem pH 9 und ebenfalls unterschiedlichen Demaskierungszeiten dar.

Dabei kam es bei den ersten Versuchen zu verschiedenen Problemen. Es traten unspezifische Färbungen mit einem zu stark gefärbten Hintergrund auf, es kam teilweise zu keiner Reaktion oder die Färbung war nur sehr schwach. Um diese Probleme zu beheben, wurde zuerst überprüft, welcher Retrieval-Puffer sich besser eignet, um die Präparate zu demaskieren. Hierbei hat sich herausgestellt, dass der Puffer mit einem pH 9,0 deutlich bessere Ergebnisse zeigte als der pH-6,0-Puffer, wie man in Abbildung 4 exemplarisch sehen kann. Im nächsten Schritt wurde die Demaskierungszeit im Retrieval-Puffer angepasst. Dabei wurde die ursprüngliche Zeit von 30 min in kleinen Schritten auf 20 min reduziert. Eine kürzere Demaskierungszeit zeigte dabei den Vorteil, dass die Färbungen weniger unspezifische Reaktionen aufwiesen. Im letzten Schritt wurden die Antikörperkonzentrationen optimiert, um eine verminderte oder eine überschießende Färbereaktion zu vermeiden. Als Grundkonzentrationen wurden die Empfehlungen des Antikörperherstellers (Abcam) umgesetzt und anschließend optimiert. Hierbei wurde geraten, eine Verdünnung der

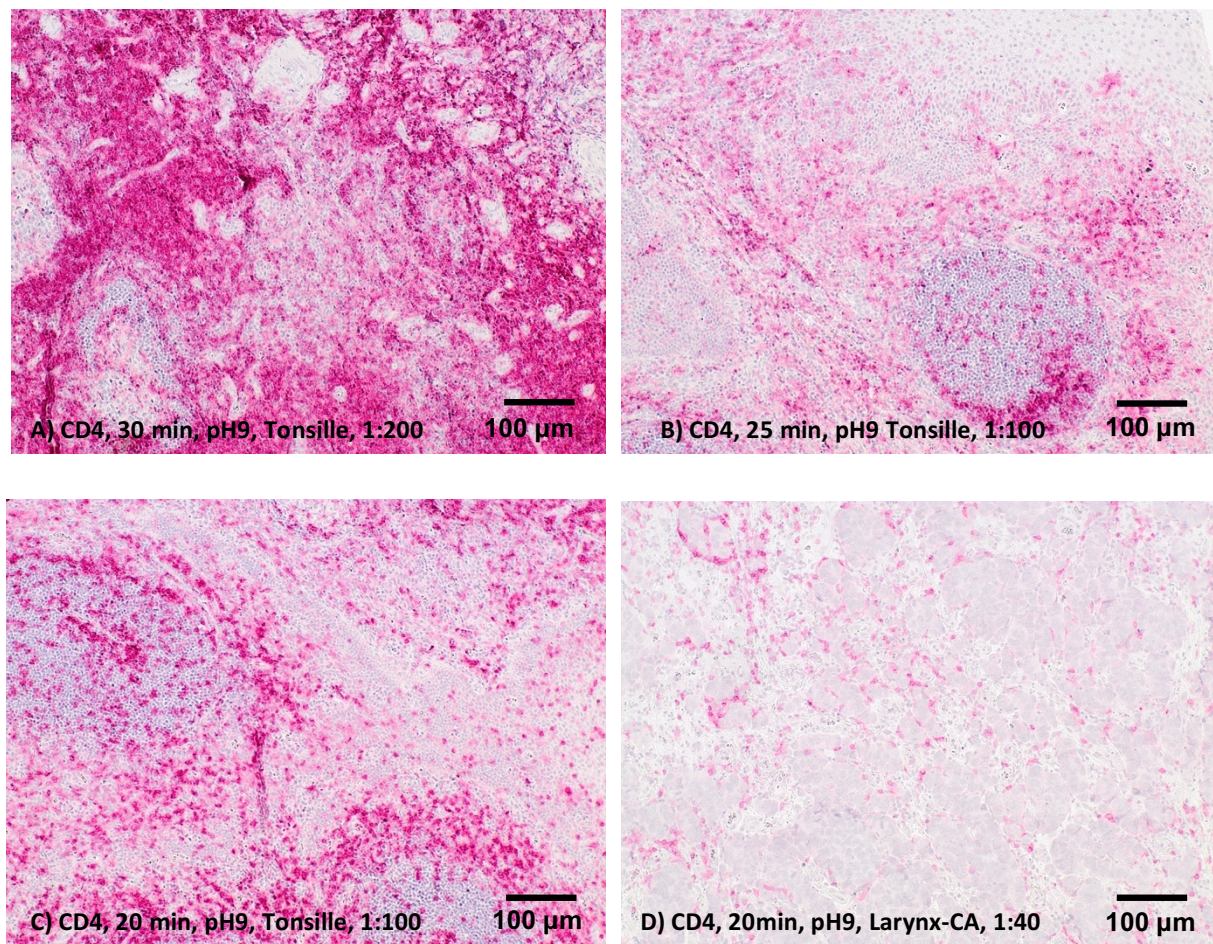


### 3. Material/Methoden

Antikörper gegen CD4 mit 1:200, gegen CD8 mit 1:200, gegen CD11c mit 1:250, gegen CD68 mit 1:400 und gegen CD163 mit 1:200 zu verwenden. Abbildung 5 zeigt exemplarisch die Konzentrationen des gegen CD4 gerichteten Antikörpers von 1:200 bis 1:40 mit den entsprechenden Färbeergebnissen.

Nach dieser Optimierung gab es bei den letztlich im definitiven Versuchsprotokoll verwendeten Antikörperkonzentrationen große Unterschiede. CD163 konnte mit einer Verdünnung von 1:16.000 gefärbt werden, CD8 mit 1:800, CD68 mit 1:200, CD11c mit 1:100 und bei CD4 war eine Konzentration von 1:40 notwendig.

Nach erfolgreicher Etablierung der Versuchsprotokolle wurde anschließend mit der Färbung der Patientenproben aus dem Kollektiv begonnen.



**Abbildung 5:** Darstellung einer Etablierungsreihe exemplarisch für den Antikörper CD4: In Bild A dargestellt ist der erste Etablierungsversuch mit einer Demaskierungszeit von 30 min, einem pH-9-Puffer und einer Antikörperverdünnung von 1:200. Die Bilder B und C zeigen Anpassungen an der Tonsille, Bild D stellt das Endergebnis an einem Larynxkarzinom dar.

#### 3.3.2 Versuchsablauf

Die aus den Patientenproben hergestellten Paraffinblöcke wurden mithilfe des Leica RM 2235 Rotationsmikrotoms geschnitten. Dazu wurden zunächst drei Schnitte von je 10 µm verworfen und im Folgenden 5-µm-Schnitte angefertigt, die nach kurzer Lagerung im Wasserbad auf Superfrost Ultra Plus Objektträger aufgebracht wurden. Nachdem die Schnitte über Nacht getrocknet worden sind, wurden sie bei 37 °C für 24 Stunden im Wärmeschrank gelagert, um eine optimale Haftung auf den Objektträgern zu gewährleisten. Zur morphologischen Kontrolle wurde von jeder Gewebeprobe eine zusätzliche HE-Färbung angefertigt.

Die 5-µm-FFPE-Gewebeschnitte wurden nun 10 min in einer absteigenden Xylol-Reihe entparaffiniert, durch je dreimaliges Schwenken in 100%igem und 70%igem Alkohol auf wässriges Milieu vorbereitet, da Xylol und Aqua dest. eine Emulsion bilden, und abschließend in Aqua dest. gewaschen. Darauf folgte ein 20-minütiger Kochvorgang bei 100 °C in Tris-EDTA-Retrievalpuffer mit einem pH 9,0 zur Demaskierung.

Anschließend, nachdem die Präparate auf eine Temperatur unter 50 °C abgekühlt und für 15 min in PBS-Puffer gewaschen wurden, folgte eine 30-minütige Inkubation mit 3% BSA, um die spätere Bindung durch den Primärantikörper zu verbessern, indem unspezifische Bindungsstellen mit BSA abgeblockt wurden.

Danach wurden die Gewebeschnitte mit den Primärantikörpern (CD4, CD8, CD11c, CD68 und CD163) für eine Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Es folgte ein 15-minütiger Waschvorgang in PBS-Puffer und die 30-minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper von dem Dako REAL Detection System. Nach erneuter Waschung in PBS für 15 min wurden die Präparate mit dem Tertiärantikörper, der ebenfalls aus dem Dako REAL Detection System entnommen wurde, für 30 min inkubiert, anschließend gewaschen und mit Chromogen-Substrat zur Farbreaktion gebracht.

Nach erneutem Waschen in Aqua dest. und einer aufsteigenden Alkohol- und Xylolreihe wurden die Präparate mithilfe des Dako K505 Sekundärkits eingedeckt.

Zur besseren Übersicht ist der Versuchsablauf in Tabelle 5 noch mal dargestellt.

**Tabelle 5:** Systematischer Ablauf der immunhistochemischen Färbung

<b>Zeitangabe</b>	<b>Durchgeführte Maßnahme</b>
24 h	Wärmeschrank 37 °C
3 x 5 min	Xylol
3 x 30 sec	100 % Alkohol
3 x 30 sec	70 % Alkohol

### 3. Material/Methoden

2 x 60 sec	Aqua dest
20 min	Kochen in Retrivalpuffer
30 min	Abkühlen unter 50 °C
3 x 5 min	Waschen in PBS-Puffer
30 min	Inkubation mit 3 % BSA
1 h	Inkubation des Primärantikörpers bei 37 °C
3 x 5 min	Waschen in PBS-Puffer
30 min	Inkubation des Sekundärantikörpers
3 x 5 min	Waschen in PBS-Puffer
30 min	Inkubation des Tertiärantikörpers
3 x 5 min	Waschen in PBS-Puffer
15 min	Chromogen
5 min	Aqua dest
7 min	Färben in Hämatoxylin
15 min	Fließend wässern
3 x 30 sec	70 % Alkohol
3 x 30 sec	100 % Alkohol
3 x 30 sec	Xylol
	Eindecken mit Entellan

#### 3.4 Analytische Methoden

##### 3.4.1 Semiquantitative Auswertung

Die Präparate wurden unter verschiedenen Aspekten beurteilt und ausgewertet. Hierbei wurde im ersten Schritt die Größe der Präparate auf einer semiquantitativen Skala von 1 bis 3 bestimmt. 1 steht dabei für Präparate, die etwa 1-10 % des Objektträgers einnahmen, 2 für Präparate, die etwa 10-20 % der Fläche eines Objektträgers ausmachten, und 3 für alle Präparate, die mehr als 20 % der Fläche des Objektträgers einnahmen. Als Nächstes wurde beurteilt, wie groß der Tumoranteil und der Stromaanteil im Präparat waren. Hierbei wurde eine Einteilung von 1-4 gewählt. Dabei wurde der Tumoranteil mit 1 – 25 %, 2 – 50 %, 3 – 75 % und 4 – 100 % bestimmt. Tumoranteil und Stromaanteil wurden in Kombination ausgewertet, sodass die Summe beider Anteile immer 100 % ergeben musste. Exemplarisch konnte so ein Tumoranteil für 1 (25 %) und entsprechend ein Stromaanteil von 3 (75 %) ausgebildet haben.

Ein vergleichbares Vorgehen wurde auch verwendet, um die Leukozytenanzahl zu bestimmen. Dabei wurde zuerst beurteilt, wie viele Leukozyten sich insgesamt im Präparat befinden. Um ein Verhältnis aufstellen zu können, wurde als Maximalwert die Anzahl von Leukozyten in verschiedenen Lymphknoten bestimmt. Die Skala reicht dabei von 1 (wenige Leukozyten) über 2 (mäßig viele Leukozyten) bis zu 3 (massive Leukozyteninfiltration). Wie oben beschrieben, wurde im folgenden Schritt die Menge an Leukozyten im Tumor und im Stroma ausgewertet. Dazu wurde die Stärke der Infiltration auf einer Skala von 1 bis 4

gemessen. Dabei zählte 1 – 25 %, 2 – 50 %, 3 – 75 % und 4 – 100 %. Die Leukozyteninfiltration wurde wie auch die Tumor- und Stromaanteile in Kombination für den Tumor und das Stroma ausgewertet, sodass als Ergebnis immer 100 % der Leukozyten im gesamten Präparat berücksichtigt wurden. Diese Werte sind natürlich abhängig von der absoluten Anzahl der Leukozyten im gesamten Präparat.

Zur Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurde ein immunreaktiver Score (IRS) verwendet, der aufgrund der individuellen Material- und Färbeeigenschaft der Präparate modifiziert wurde, da der klassischerweise verwendete immunreaktive Score nach Remmele und Stegner (RemmeleStegner 1987), welcher ursprünglich für den Nachweis von Östrogen- und Progesteronrezeptoren auf Mammakarzinomzellen entwickelt worden ist, sich zum einen mit der relativen Anzahl der positiven Zellen und zum anderen mit der Intensität der Färbung beschäftigt. Da es in dieser Arbeit aber um den Nachweis von Immunzellen in Tumor und Stroma geht, spielt die Intensität bei einer positiven Reaktion eine untergeordnete Rolle. Aus diesem Grund wurde der IRS so verändert, dass sich das Ergebnis aus der relativen Anzahl der im Präparat gefärbten Immunzellen und der absoluten Anzahl der im Tumor oder Stroma vorhandenen Leukozyten zusammensetzte. Als maximalen Wert kann der im Folgenden als modifizierte IRS (mIRS) bezeichnete Score, angelehnt an den ursprünglichen IRS, 12 erlangen. Dies würde bedeuten, dass alle Immunzellen im Tumor oder im Stroma mithilfe eines Antikörpers gefärbt sind.

Um zwischen dem Tumor und dem Stroma differenzieren zu können, wurde einmal ein modifizierter IRS für den Tumor in dem jeweiligen Präparat gebildet und einmal ein modifizierter IRS für die peritumorale Zone (Stroma).

Die Auswertung der verschiedenen immunhistochemischen Färbungen erfolgte stets durch drei verschiedene, hinsichtlich der histologischen Diagnose des zu begutachtenden Präparats, der entsprechenden klinischen Daten und der Bewertung durch die anderen Auswerter verblindete Personen, davon ein Facharzt für Pathologie.

#### 3.4.2 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen der immunhistochemischen Färbungen wurden mithilfe eines D'Agostino-&-Pearson-normalityTests sowie eines zweiseitigen Mann-Whitney-U Tests unter Verwendung der GraphPad Prism 7.0 Software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Zur Analyse der Überlebensdaten der Patienten wurde ein Mantel-Cox-



### 3. Material/Methoden

Test (log-rank-Test) verwendet. P-Werte  $< 0,05$  wurden bei einem vorgegebenen Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  als statistisch signifikant gewertet.

#### 3.4.3 Anonymisiertes Patientenkollektiv

In dieser Arbeit wurden Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete (FFPE) Gewebeschnitte von 103 HNSCC-Patienten mit unterschiedlichem Vitamin-D-Serumspiegel untersucht. Das Kollektiv gliedert sich dabei in 44 HNSCC-Patienten mit einem Vitamin-D-Serumspiegel über 15 ng/ml und 59 HNSCC-Patienten mit einem Vitamin-D-Serumspiegel unter 10 ng/ml. Alle Patientenproben wurden im Vorfeld anhand von histopathologischen Gutachten von ärztlichen Mitarbeitern des Pathologischen Instituts untersucht und als Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich diagnostiziert. (Siehe Tabelle 1)

Die Patienten wurden darüber aufgeklärt, dass ihr Gewebe nach der klinischen Untersuchung auch zu Forschungszwecken genutzt werden kann, und haben eine Einverständniserklärung unterzeichnet. Sämtliche Versuche wurden in einem Votum der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes (280/10) genehmigt.

##### 3.4.3.1 Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel

Geschlecht	Alter	Diagnose	TNM-Stadium	Vitamin D [ng/ml]
m	65	Larynx-CA	cT1a cN0 cM0 G1	9,2
m	57	Larynx-CA	cT1a cN0 cM0 G2	5,8
m	79	Tonsillen-CA	pT1 pN1 cM0 G3	4
m	67	Mundboden-CA	pT1 pN0 cM0 G2	5,8
m	47	Tonsillen-CA	pT1 pN1 pM1 G2	8
m	56	Larynx-CA	cT2 cN0 cM0 G3	4,5
m	57	Gaumenbogen-CA	cT1 pN2c cM0 G2	9,1
w	68	Larynx-CA	pT1a cN0 cM0 G3	4,8
m	63	Zungengrund-CA	pT1a pN2b pM1 G3	8
m	55	Zungengrund-CA	pT1a cN2a cM0 G3	5,4
m	51	Tonsillen-/Zungengrund-CA	cT2 cN2c cM0 G3	8
m	49	Zungengrund-CA	cT2 cN2c cM0 G3	8,8
m	74	Larynx-CA	cT2 cN0 cM0 G2	7,6
m	60	Larynx-CA	cT2 cN0 Mx G2	9,3
m	58	Zungengrund-Ca	cT2 cN0 cM0 G2	8,4
m	57	Larynx-CA	cT2 cN2c cM0 G2	5
m	73	Hypopharynx-CA	cT2 cN3 cM0 G3	7,8
m	69	Larynx-CA	cT2 pN2b cM0 G3	6,7
w	78	Tonsillen-CA	cT2 cN2b cMx G3	8,1
w	66	Hypopharynx-CA	cT2 cN3 cM0 G2	5,8



### 3. Material/Methoden

m	48	Zungen-CA	pT3 pN0 cM0 G2	6,1
m	75	Hypopharynx-CA	cT2 pN0 cM0 G2	8,6
w	68	Hypopharynx-CA	cT2 cN0 cM0 G2	4,2
m	58	Mundboden-CA	cT2 cN0 cM0 G3	5,9
m	69	Gaumenbogen-CA	pT2 pN2c cM0 G2	7,45
m	53	Hypopharynx-CA	pT2 pN2b cM0 G2	9,9
m	71	Larynx-CA	pT2 pN2b cM0 G2	9
w	59	Tonsillen-CA	pT2 pN1 cM0 G3	7,2
m	56	Zungengrund-CA	pT2 pN1 cM0 G2	6,2
m	59	Mundboden-CA	pT2 pN3 cM0 G2	5,4
m	61	Larynx-CA	cT3 cN3 M0 G2	4,2
m	78	Larynx-CA	cT3 cN2b cM0 G2	4
m	58	Zungengrund-CA	cT3 pN2b cM0 G3	8
w	56	Tonsillen-CA	cT3 cN2b cMx G3	5,6
m	50	Larynx-CA	cT2 pN1 cM0 G2	5,9
m	59	Zungen-CA	cT3 cN1 cM1 G3	5,3
m	87	Hypopharynx-CA	cT3 cN1 CM0 G3	< 4,0
m	71	Hypopharynx-CA	cT3 cN2c cM0 G3	5,8
m	64	Larynx-CA	cT3 PN0 cM0 G2	7,8
m	60	Larynx-CA	cT3 cN0 cMx G2	8,2
m	59	Hypopharynx-CA	cT3 cN2c cM0 G3	4,8
m	75	Larynx/Hypopharynx-CA	cT4a pN0 cM0 G3	5,5
w	58	Tonsillen-CA	cT4 pN2b cM0 G3	5,4
m	64	Zungen-CA	cT2 cN0 cM0 G1	8,8
m	56	Zungengrund-CA	cT4 cN2c cM0 G2	5,3
m	59	Hypopharynx-, Larynx-CA	cT4 cN2b cM0 G2	7,8
m	42	Lokalrezidiv Zungen-CA	cT3 cN0 cM0 G3	6
m	65	Zungengrund-CA	cT4 cN2c cM0 G2	4
m	64	Larynx-CA	cT4 pN0 cM0 G2	7
m	53	Larynx-Hypopharynx-Oropharynx-CA	cT4 cN2b cMx G3	4
m	68	Larynx-CA	cT4 cN2c cM0 G2	4,8
m	73	Oro-, Hypopharynx- und Larynx-CA	cT4 cN2b cM0 G3	8,7
m	60	Larynx-CA	cT4a cN1 cM0 G2	9,4
m	64	Gaumenbogen-CA	cT4a cN2c cMx G2	4,9
m	66	Zungen-CA	cT4b cN3 cM0 G2	6,4
m	66	Zungengrund-CA	cT4b cN3 cM1 G3	8,5
m	68	Hypopharynx-, Larynx-CA	pT4a pN1 cM0 G2	5,6
m	74	Larynx-CA	pT4a pN2c M0 G3	6,5
m	70	Larynx-CA	pT2b CN2b cM0 G2	5,5

### 3. Material/Methoden

#### 3.4.3.2 Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung

Geschlecht	Alter	Diagnose	TNM-Stadium	Vitamin D [ng/ml]
m	56	Mundboden-CA	cT1 cN0 cM0 G2	25,2
w	65	Tonsillen-CA	cT1 cN2c cMx G2	21,6
m	61	Zungengrund-CA	pT1 pN2b cM0 G2	40,8
m	65	Larynx-CA	pT1 cN0 cM0 G2	31,1
w	47	Zungen-CA	pT1 pN0 cM0 G2	22,8
w	82	Larynx-CA	pT1a cN0 cM0 G2	15,5
m	58	Gaumenbogen-CA	cT2 cN2b cM0 G2	20,8
m	51	Zungengrund-CA	cT2 cN2b cM0 G2	24
m	72	Zungengrund-CA	cT2 cN2b cM0 G3	19,7
m	82	Larynx-CA	cT2 cN2b cM0 G3	16,1
m	71	Zungenrand-CA	cT2 cN0 cM0 G3	15,7
w	87	Tonsillen-CA	cT2 cN0 cM0 G3	29,9
m	60	Tonsillen-CA	cT2 cN2b cM0 G3	16,4
m	66	Tonsillen-CA	cT2 cN2c cM0 G2	19,4
m	84	Zungen-CA	pT2 pN2b cM0 G2	18,8
m	72	Zungen-CA	pT2 pN2b cM0 G3	31,1
m	60	Tonsillen-CA	pT2 pN2b cM0 G3	29,6
w	80	Wangen-CA	pT2 pN0 cM0 G2	33,3
w	48	Tonsillen-CA	pT2 pN1 cM0 G2	29,1
w	50	Larynx-CA	pT2 pN0 cM0 G3	19,4
w	59	Zungen-CA	pT2 cN0 cM0 G2	38,2
m	80	Tonsillen-CA	pT2 pN1 cM0 G2	21,5
w	54	Zungengrund-CA	pT2 pN0 cM0 G2	15,8
m	74	Larynx-CA	cT3 cN0 cM0 G3	18,7
m	73	Tonsillen-CA	cT3 pN2b cM0 G3	16
m	50	Zungengrund-CA	cT3 cN0 cM0 G2	16,8
m	66	Hypopharynx-CA	cT3 cN0 cM0 G2	16,2
m	61	Tonsillen-CA	cT3 N2b cM0 G3	19,8
m	80	Nasopharynx-CA	cT3 cN2b cM1 G2	21,1
m	60	Gaumenbogen-CA	pT3 pN0 cM0 G2	26,3
m	53	Mundboden-CA	pT3 pN2c cM0 G2	64,1
m	75	Tonsillen- und Zungengrund-CA	pT3 pN2b cM0 G3	23,4
m	65	Zungengrund-Ca	rpT3 cN0 cM0 G3	18,5
w	61	Zungengrund-CA	cT4 cN2 cM1 G3	28,7
m	54	Hypopharynx-CA	cT4 cN0 cMx G3	38,8
m	60	Hypopharynx-, Larynx-CA	cT4 cN2c cM1 G3	18,1
w	63	Mundboden-CA	cT4 cN2c cM0 G2	22,1
m	73	Hypopharynx-, Larynx-CA	cT4 cN2b cM0 G2	16,6
w	58	Tonsillen-CA	cT4 pN1c cM0 G3	16,5
m	61	Hypopharynx-Larynx-CA	rcT4 cN1 cM0 G3	29,6

### 3. Material/Methoden

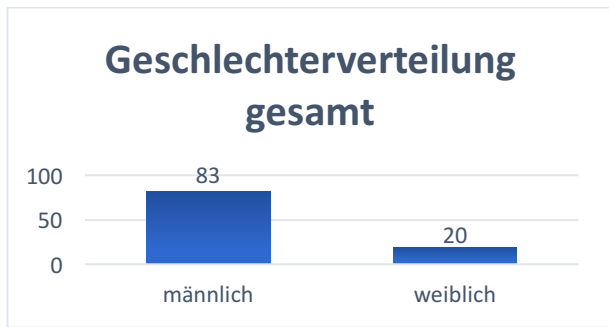
m	56	Larynx-CA	cT4a cN2b cM0 G3	24,9
m	65	Larynx-CA	cT4a cN2c cM1 G2	21,8
m	79	Larynx-CA	rpT4a cN0 cM0 G2	22,1
w	34	Zungenrand-CA	pT2 pN1 cM0 G2	18,7

## 4. Ergebnisse

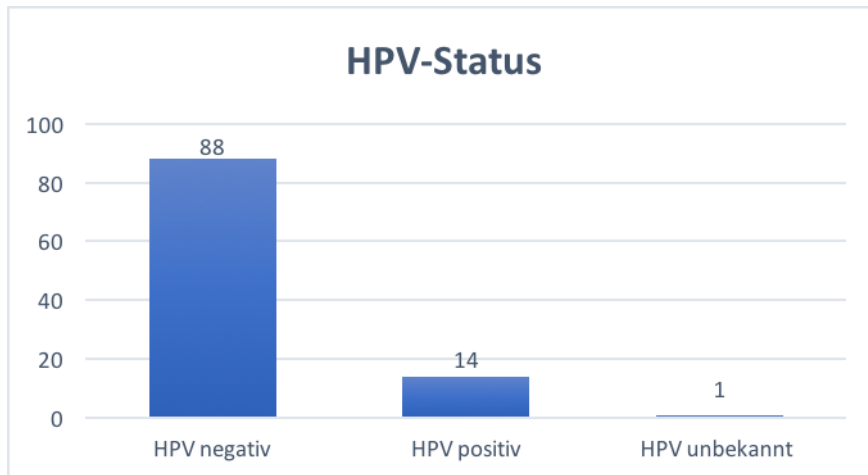
### 4.1 Beschreibung des Patientenkollektivs

Von den 103 eingeschlossenen HNSCC-Patienten waren 83 männlich und 20 weiblich (Abb. 6). Das Durchschnittsalter betrug bei den Frauen 62,9 Jahre und bei den Männern 63,8 Jahre. Alle Frauen und Männer hatten ein Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich, welches von dem Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes abschließend diagnostiziert und klassifiziert wurde. Bei den Tumoren waren verschiedene Stadien von einem cT1a-cN0-cM0-Stadium bis zu einem cT4b cN3 cM1 vertreten. Es handelte sich in der Mehrzahl der für die Untersuchungen verwendeten Gewebeproben um Primärresektate, bei fehlender Verfügbarkeit von Primärtumormaterial wurde in einzelnen Fällen auch eine vor der eigentlichen Tumorresektion gewonnene Biopsie oder eine Lymphknotenmetastase des Tumors verwendet. 88 Patienten hatten einen HPV-negativen Tumor, 14 Patienten einen HPV-positiven Tumor und bei einem Patienten war der HPV-Status unbekannt (Abb. 7). Die Bestimmung des HPV-Status bei HNSCCs ist nicht einheitlich definiert und es existiert derzeit noch kein zugelassener Abstrichtest, der eine zuverlässige Aussage zulassen würde. Derzeit ist es möglich, die HPV-DNA durch Polymerasekettenreaktionen (PCR) nachzuweisen, eine DNA-in-situ-Hybridisierung vorzunehmen oder für Hochrisikotypen assoziierte Proteinbiomarker wie z. B. p16INK4a, pRb, p53 und Cyclin D1 einen immunhistochemischen Nachweis zu verwenden. Um diese Problematik zu lösen, wurde der HPV-Status der Patienten des vorliegenden Kollektivs mit dem gleichzeitigen immunhistochemischen Nachweis von p16INK4a als Biomarker in Verbindung mit einer Hochrisiko-HPV-Infektion und Ki67 als Marker für eine hohe Zellproliferationsrate mit einem CINtec PLUS-Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) und dem Nachweis von HPV-DNA durch spezifische PCR bestimmt (Linxweiler & Schick 2015).

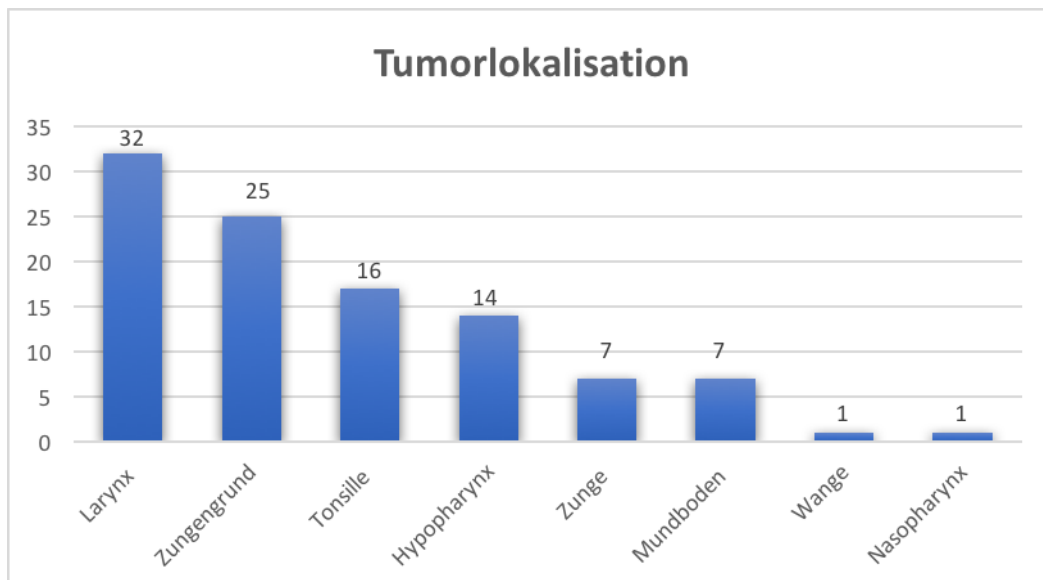
## 4. Ergebnisse



**Abbildung 6:** Statistische Auswertung der Geschlechterverteilung. Die Daten werden mithilfe eines Säulendiagramms dargestellt. 83 der 103 Patienten der Studie waren männlich, 20 Patienten waren weiblich.



**Abbildung 7:** Statistische Auswertung des HPV-Status. Die Daten werden mithilfe eines Säulendiagramms dargestellt. 88 der 103 Patienten waren HPV-negativ, 14 Patienten HPV-positiv und bei 1 Patienten war der HPV-Status unbekannt.



**Abbildung 8:** Statistische Auswertung der Tumorlokalisation: Die Daten wurden mithilfe eines Säulendiagramms dargestellt. In absteigender Reihenfolge war das Larynxkarzinom die häufigste Tumorentität (n = 32) gefolgt von Tumoren des Zungengrundes (n = 25), der Tonsille (n = 16), des Hypopharynx (n = 14), der Zunge (n = 7), des Mundbodens (n = 7), des Nasopharynx (n = 1) und der Wange (n = 1).

Die Plattenepithelkarzinome, die in dieser Arbeit untersucht wurden, gliedern sich in Larynx-, Mundboden-, Tonsillen-, Zungengrund-, Zungen-, Hypopharynx-, Wangen- und

Nasopharynxkarzinome. Am häufigsten vertreten war das Larynxkarzinom mit 32 Fällen, gefolgt von dem Zungengrundkarzinom mit 25 Fällen und dem Tonsillenkarzinom mit 16 Fällen. Am seltensten waren das Nasopharynxkarzinom und das Wangenkarzinom mit je einem Fall vertreten (Abb. 8).

### 4.2 Präparat-Charakteristika

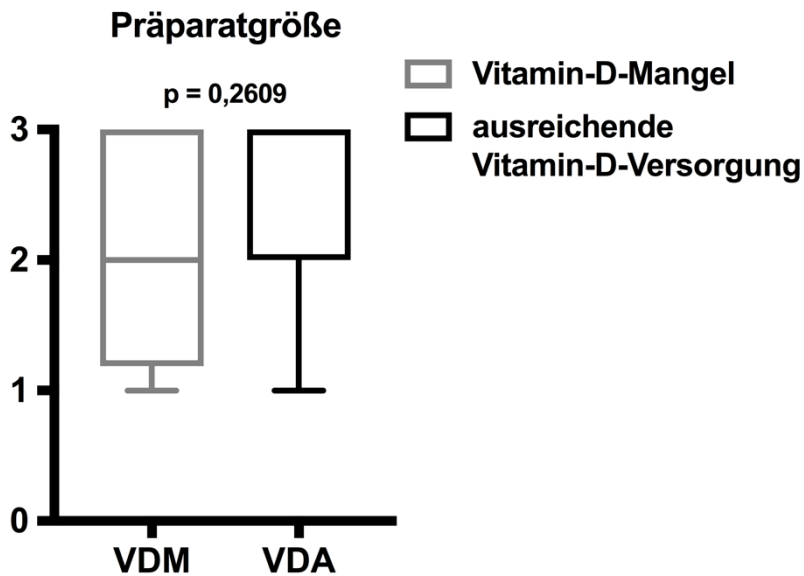
Die Auswertung der Präparate gliedert sich in zwei Kollektive. Die Differenzierung der beiden Kollektive erfolgte anhand der Vitamin-D-Serumspiegel der Patienten. Dabei wurde festgelegt, dass alle Patienten mit einem Vitamin-D-Serumspiegel von unter 10 ng/ml zu dem „Vitamin-D-Mangel-Kollektiv“ (VDM) gehören und alle Patienten mit einem Vitamin-D-Serumspiegel von über 15 ng/ml dem „Kollektiv mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung“ (VDA) zugeordnet werden.

Um sicherzustellen, dass alle Präparate dieselben Eigenschaften besitzen, wurden zunächst einige Charakteristika wie die Präparategröße, der Tumoranteil, der Stromaanteil und die Leukozyteninfiltration ausgewertet, um eine mögliche Verfälschung der immunhistochemischen Ergebnisse durch diese Parameter auszuschließen.

In Abbildung 9 ist in Schwarz die Patientengruppe mit einem Vitamin-D-Mangel ( $< 10$  ng/ml) dargestellt, in Grau sieht man die Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung ( $> 15$  ng/ml).

Die Präparate der Kollektive mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung (VDA) und einem Vitamin-D-Mangel (VDM), welche mithilfe einer Größeneinteilung von 1-3 ausgewertet wurden, wiesen diesbezüglich keinen signifikanten Unterschied auf ( $p = 0,2609$ ). Der Median der VDM-Gruppe lag bei 2, während der Median der VDA-Gruppe bei 3 lag. Der Mittelwert für die Vitamin-D-Mangel-Gruppe betrug 2,177, während der Mittelwert der VDA-Gruppe bei 2,347 lag.

Der Standardfehler für die VDM-Gruppe war 0,1077, die der VDA-Gruppe 0,1212. Daraus kann man schließen, dass alle Präparate in etwa dieselbe Größe hatten und in der Regel 10-40 % der Objektträgeroberfläche einnahmen.



**Abbildung 9:** Statistische Auswertung der Präparatgröße. Die Größe der Präparate wurde mithilfe einer Skala von 1 bis 3 bewertet und in Boxplots dargestellt. Jede Box stellt den Interquartilsabstand dar und der Median wird durch eine Linie angezeigt. Die Whisker stellen maximal den 1,5-fachen Interquartilsabstand dar (nach Tukey). VDM steht für das Kollektiv mit einem Vitamin-D-Mangel und VDA für das Kollektiv mit der ausreichenden Vitamin-D-Versorgung.

#### 4.2.1 Auswertung Tumoranteil/Stromaanteil

Um einen Überblick zu bekommen, wie Tumor und Stroma in den Präparaten verteilt sind, wurden die Präparate auf einer Skala von 1 bis 4 (siehe Material und Methoden) nach ihrem Tumor- und Stromaanteil beurteilt. Dabei handelt es sich um eine kombinierte Auswertung, sodass die Summe immer einen Score von 4 (= 100 % des Präparats) ergab.

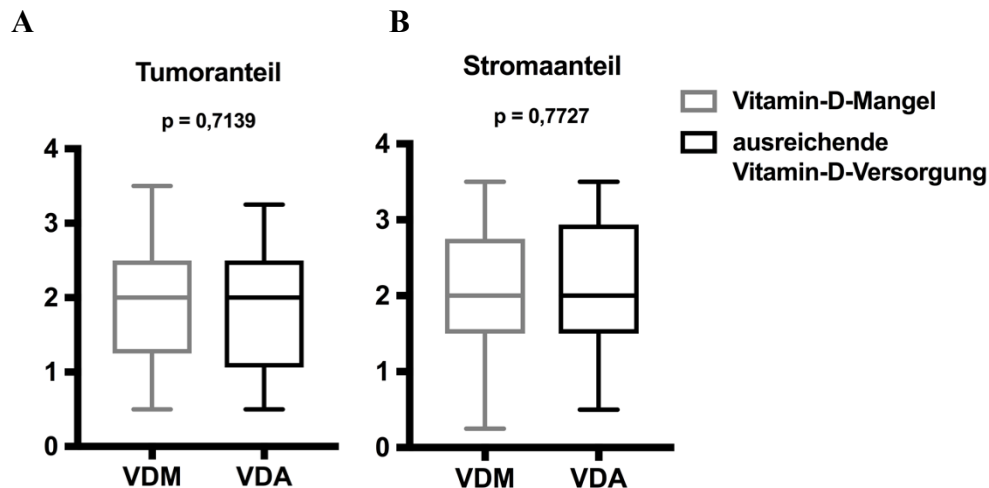
In Abbildung 10A kann man in Schwarz dargestellt den Tumoranteil des VDM-Kollektivs und in Grau dargestellt den Tumoranteil des VDA-Kollektivs sehen. Wie aus der Grafik ersichtlich wird, gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Kollektiven in Bezug auf den Tumoranteil ( $p = 0,7139$ ). Der Median für die Patienten mit dem Vitamin-D-Mangel betrug genauso wie der der Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung 2.

Die Mittelwerte waren ebenfalls vergleichbar. Das VDM-Kollektiv hatte einen mittleren Tumoranteil von 1,974, das VDA-Kollektiv einen mittleren Tumoranteil von 1,909. Der Standardfehler betrug 0,1036 für die VDM-Gruppe und 0,1195 für die VDA-Gruppe.

Aus diesen Daten wird ersichtlich, dass die Präparate sowohl gleich groß waren als auch, in Bezug auf ihre jeweilige Größe, denselben Tumoranteil zeigten.

## 4. Ergebnisse

Für den Stromaanteil zeigte sich ein ähnliches Bild. Wie in Abbildung 10B dargestellt, unterschieden sich die Stromaanteile der beiden Kollektive nicht signifikant ( $p = 0,7727$ ). Der Median betrug bei beiden Gruppen 2, der Mittelwert für das VDM-Kollektiv betrug 2,056 und für das VDA-Kollektiv 2,102.



**Abbildung 10 (A und B):** Statistische Auswertung des Tumoranteils (Abb. A) und des Stromaanteils (Abb. B) der Präparate. Die Tumor- und Stromaanteile wurden mithilfe einer Skala von 1 bis 4 bewertet und in Boxplots dargestellt. Jede Box stellt den Interquartilsabstand dar, der Median wird durch eine Linie angezeigt. Die Whisker stellen maximal den 1,5-fachen Interquartilsabstand dar (nach Tukey). VDM steht für das Kollektiv mit einem Vitamin-D-Mangel und VDA für das Kollektiv mit der ausreichenden Vitamin-D-Versorgung.

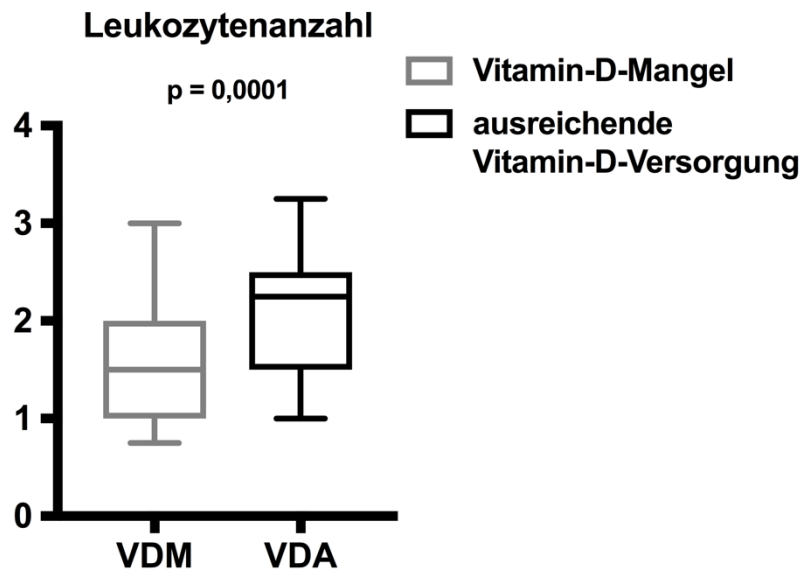
### 4.2.2 Leukozytenzahl

Die Leukozytenzahl im Präparat hat einen wichtigen Einfluss auf die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen, sodass dieser Aspekt gesondert berücksichtigt und für alle Präparate ausgewertet wurde. Durch die bestimmte Menge der im Präparat vorhandenen Leukozyten konnte eine erste Erkenntnis darüber getroffen werden, ob eine deutliche oder weniger deutliche Färbereaktion zu erwarten war. Zudem ermöglichte eine Auswertung anhand einer HE-Färbung eine erste Aussage zu einer potenziell von Vitamin D abhängigen Infiltration durch alle Immunzellen, ohne dabei weiter zwischen den verschiedenen Immunzellpopulationen differenzieren zu können.

Betrachtet man in Abbildung 11 die Leukozytenanzahl im Präparat, so kann man feststellen, dass es einen hochsignifikanten Unterschied zwischen dem VDM-Kollektiv und dem VDA-Kollektiv gab ( $p = 0,0001$ ). In den Präparaten der Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung fanden sich deutlich mehr Leukozyten als in den Präparaten der Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel. Der Median bei dem VDM-Kollektiv betrug 1,5, während der



Median für das VDA-Kollektiv 2,25 betrug. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei der Betrachtung der Mittelwerte. Das VDM-Kollektiv hatte einen Mittelwert von 1,578, das VDA-Kollektiv hatte einen Mittelwert von 2,091. Der Standardfehler betrug bei beiden Kollektiven 0,08.



**Abbildung 11:** Statistische Auswertung der Leukozytenzahl. Die Leukozytenzahl im Präparat wurde mithilfe einer Skala von 1 bis 3 bewertet und in Boxplots dargestellt. Jede Box stellt den Interquartilsabstand dar, der Median wird durch eine Linie angezeigt. Die Whisker stellen maximal den 1,5-fachen Interquartilsabstand dar (nach Tukey). VDM steht für das Kollektiv mit einem Vitamin-D-Mangel und VDA für das Kollektiv mit der ausreichenden Vitamin-D-Versorgung.

### 4.2.3. Leukozytenzahl Tumor/Stroma

Als nächster Schritt wurde ausgewertet, wie die Leukozyten im Präparat zwischen Tumor und peritumoralem Stroma verteilt war. Dieser Schritt diente dazu, weitere Aussagen über das lokalisationsspezifische Infiltrationsverhalten von Leukozyten treffen zu können. Zudem konnten so erste Tendenzen über den Einfluss von Vitamin D auf die Infiltration beobachtet werden.

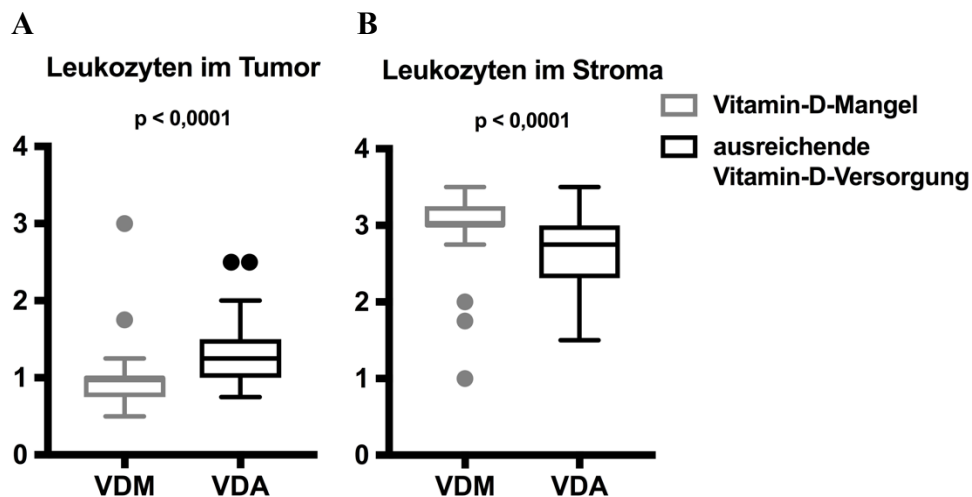
Bei den nachfolgenden beiden Abbildungen handelt es sich um die Auswertung der Leukozytenverteilung. In Abbildung 12A ist die Leukozytenanzahl im Tumor dargestellt, in Abbildung 12B die Leukozytenanzahl im Stroma. Jeweils in Schwarz dargestellt, sind die Ergebnisse für die Leukozytenzahl bei dem Kollektiv mit einem Vitamin-D-Mangel, in Grau die Ergebnisse für das Kollektiv mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung. Betrachtet man nun zunächst die Leukozytenzahl im Tumor, so stellt man fest, dass die Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung eine signifikant höhere Zahl an Leukozyten im

#### 4. Ergebnisse

Tumor hatten als die Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel ( $p < 0,0001$ ). Der Median betrug hier für die VDM-Gruppe 1 und für die VDA-Gruppe 1,25. Der Mittelwert lag für die VDM-Gruppe bei 0,9693 und für die VDA-Gruppe bei 1,352. Der Standardfehler betrug 0,043 für die VDM- und 0,067 für die VDA-Patienten.

Dieses Ergebnis wurde inhaltlich bestätigt durch die Auswertung der gesamten Leukozyteninfiltration im Tumor. Auch hier konnte deutlich gezeigt werden, dass die Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung insgesamt eine signifikant höhere Leukozyteninfiltration zeigten.

Bei der Betrachtung von Abbildung 12B fällt auf, dass sich hier ein gegensätzliches Bild abzeichnete. Im Stroma waren bei einem Vitamin-D-Mangel signifikant mehr Leukozyten vorhanden als bei den Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung ( $p < 0,0001$ ). Der Median betrug für die VDM-Patienten 3 und für die VDA-Patienten 2,75. Der Mittelwert lag bei den VDM-Patienten bei 2,991, während der Mittelwert für die Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung bei 2,67 lag. Der Standardfehler betrug 0,049 für die VDM-Gruppe und 0,066 für die VDA-Gruppe. Im Gegensatz zu den oben genannten Ergebnissen korreliert hier also der Vitamin-D-Serumspiegel nicht mit einer erhöhten Leukozyteninfiltration im peritumoralen Stroma.



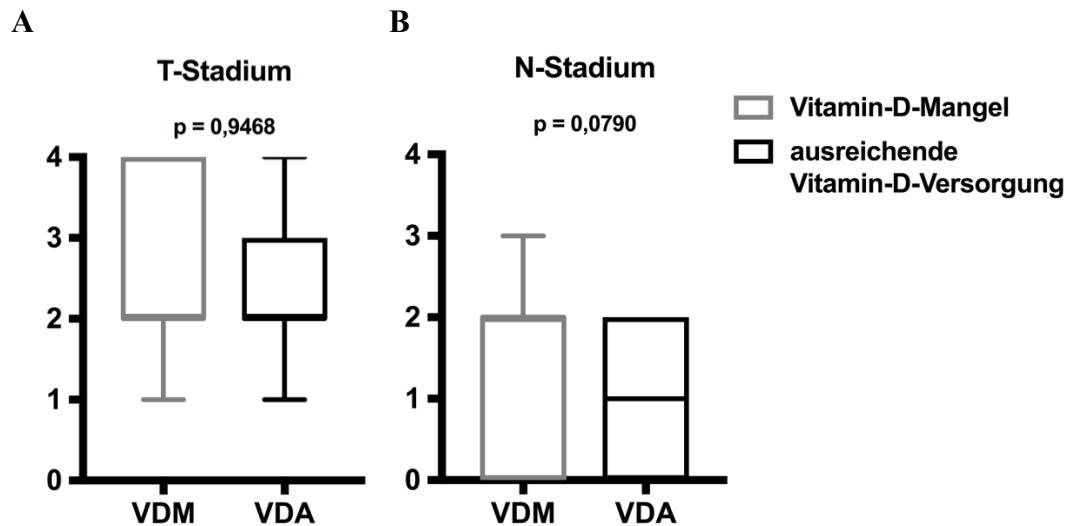
**Abbildung 12 (A und B):** Statistische Auswertung der Leukozyten im Tumor (Abb. A) und der Leukozyten im Stroma (Abb. B) der Präparate. Die Tumor- und Stromaanteile wurden mithilfe einer Skala von 1 bis 4 bewertet und in Boxplots dargestellt. Jede Box stellt den Interquartilsabstand dar, der Median wird durch eine Linie angezeigt. Die Whisker stellen maximal den 1,5-fachen Interquartilsabstand dar (nach Tukey). VDM steht für das Kollektiv mit einem Vitamin-D-Mangel und VDA für das Kollektiv mit der ausreichenden Vitamin-D-Versorgung.

### 4.2.4 Auswertung T- und N-Stadium

Abgesehen von den Präparateeigenschaften wie Größe, Tumor-/Stromaverteilung und Leukozyteninfiltration war es auch wichtig zu wissen, in welchem Stadium sich der Tumor zur Zeit der Operation befand, da das Tumorstadium einen entscheidenden Einfluss auf die Prognose hat und sich die Definition des Therapieerfolgs und dessen Beurteilung nach dem Staging richtet. Je ausgedehnter der Tumor ist, desto höher ist die Stadieneinteilung und desto schlechter ist die Prognose. Beim Hypopharynxkarzinom zum Beispiel beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate bei einer Diagnose in einem frühen TNM-Stadium 70 % und bei einer Diagnose mit einem fortgeschrittenen TNM-Stadium nur 20 % (Carvalho et al. 2004). Dazu wurden die T- und die N-Stadien der Tumoren ausgewertet. „T“ steht für die Ausdehnung und Größe des Primärtumors und „N“ für den Befall von Lymphknoten (näheres siehe Einleitung).

In der Abbildung 13 werden die T- und N-Stadien in Bezug auf den Vitamin-D-Serumspiegel miteinander verglichen. In Abbildung 13A ist in Schwarz dargestellt, das T-Stadium der Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel, und in Grau dargestellt, das T-Stadium der Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung. Wie deutlich zu erkennen ist, gab es keinen signifikanten Unterschied bei den T-Stadien ( $p = 0,9468$ ). Der Median lag bei beiden Gruppen bei 2. Der Mittelwert betrug bei den VDM-Patienten 2,593 und bei den VDA-Patienten bei 2,565. Der Standardfehler nahm für das VDM-Kollektiv den Wert 0,134 und für das VDA-Kollektiv den Wert 0,150 an.

Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei Betrachtung des N-Stadiums (Abbildung 13B). Auch hier ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten mit Vitamin-D-Mangel und den Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung ( $p = 0,0790$ ). Allerdings war hier im Gegensatz zu den T-Stadien ein gewisser Trend zu erkennen hin zu höheren N-Stadien in dem VDM-Kollektiv. Der Median lag bei dem VDM-Kollektiv bei 2 und bei dem VDA-Kollektiv bei 1. Der Mittelwert betrug für das VDM-Kollektiv 1,339 und für das VDA-Kollektiv. Der Standardfehler war 0,133 bei der VDM-Gruppe und 0,139 bei der VDA-Gruppe.



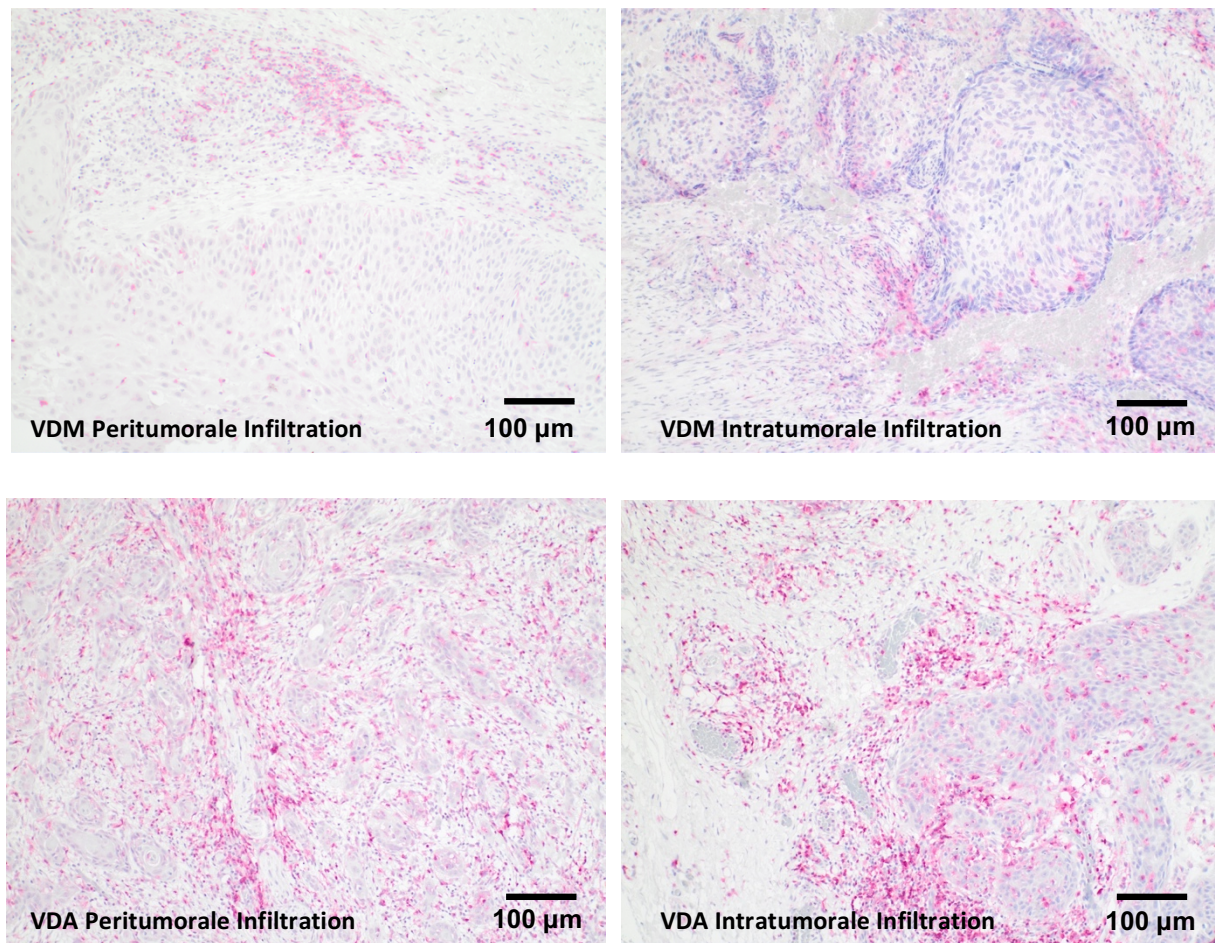
**Abbildung 13 (A und B):** Statistische Auswertung des T-Stadiums (Abb. A) und des N-Stadiums (Abb. B) der Präparate. Die T- und N-Stadien wurden hinsichtlich des Vitamin-D-Einflusses bewertet und in Boxplots dargestellt. Jede Box stellt den Interquartilsabstand dar, der Median wird durch eine Linie angezeigt. Die Whisker stellen maximal den 1,5-fachen Interquartilsabstand dar (nach Tukey). VDM steht für das Kollektiv mit einem Vitamin-D-Mangel und VDA für das Kollektiv mit der ausreichenden Vitamin-D-Versorgung.

#### 4.3 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen

Alle Präparate der 103 Patienten aus dem gesamten Kollektiv wurden mit verschiedenen Antikörpern immunhistochemisch gefärbt, um eine Aussage darüber treffen zu können, wie Vitamin D die tumorspezifische Immunabwehr unterstützen kann. Dazu wurden Antikörper gegen CD4 verwendet, um die T-Helferzellen nachzuweisen, Antikörper gegen CD8, um zytotoxische T-Zellen nachzuweisen, CD11c-Antikörper, um M1-Makrophagen nachzuweisen, CD68-Antikörper, um die gesamte Makrophagenpopulation darzustellen, und Antikörper gegen CD163, um M2-Makrophagen nachzuweisen. Es wurde immer zwischen der Tumordinfiltration und der Infiltration in peritumorales Gewebe unterschieden. Im Folgenden werden nun die verschiedenen Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen für die einzelnen Immunzellpopulationen dargestellt und beschrieben.

## 4. Ergebnisse

### 4.3.1 Ergebnisse der CD4-Immunhistochemie bei HNSCCs



**Abbildung 14:** Tumorspezifische Infiltration mit Immunzellen. Repräsentative immunhistochemische Färbungen CD4-positiver Zellen eines Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel und ausreichender Vitamin-D-Versorgung. Es ist jeweils eine peritumorale Infiltration und eine intratumorale Infiltration dargestellt.

Abbildung 14 zeigt exemplarische Färbungen CD4-positiver Zellen bei einem Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (VDM) und einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung (VDA), dargestellt jeweils für die peri- und intratumorale Immuneinfiltration. Die vom Antikörper gefärbten Zellen sind in Rot zu erkennen, das Plattenepithelkarzinom kennzeichnet sich durch invasives Wachstum und Bildung von Tumorzellinseln oder Tumorzellsträngen. Es ist deutlich zu sehen, dass die Färbungen der Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung eine größere Zahl gefärbter Zellen zeigten als die Färbungen der Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel.

Die statistische Auswertung der Infiltration von T-Helferzellen ( $CD4^+$ ) ist in Abbildung 15 dargestellt und verdeutlicht den Eindruck der Bilder. Auf der linken Seite sieht man die peritumorale Infiltration, auf der rechten Seite die intratumorale Infiltration. Jeweils in Grau ist das Patientenkollektiv mit einem Vitamin-D-Mangel dargestellt, in Schwarz das



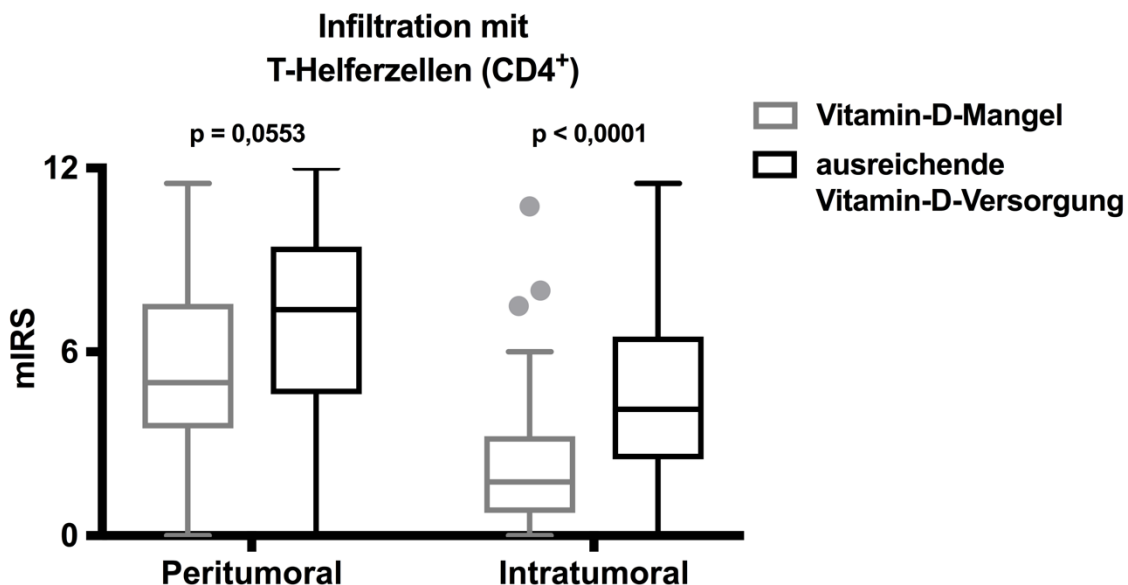
#### 4. Ergebnisse

Patientenkollektiv mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung. Auf der y-Achse ist der modifizierte immunreaktive Score (mIRS) aufgetragen.

Betrachtet man die peritumorale Infiltration, so kann man feststellen, dass es eine deutliche Tendenz in Richtung einer positiven Korrelation zwischen der Vitamin-D-Versorgung und der Infiltration mit  $CD4^+$ -Zellen gab, auch wenn das Ergebnis knapp nicht signifikant war ( $p = 0,0553$ ). Der Mittelwert betrug für die peritumorale Infiltration bei dem VDM-Kollektiv 5,431 mit einem Standardfehler von 0,426 und bei dem VDH-Kollektiv 6,682 mit einem Standardfehler von 0,483.

Die intratumorale Infiltration zeigte ein eindeutigeres Ergebnis. Im Vergleich zu den Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel hatten die Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung eine deutlich höhere Infiltration von T-Helferzellen im Tumor. Dieses Ergebnis war statistisch hochsignifikant ( $p < 0,0001$ ).

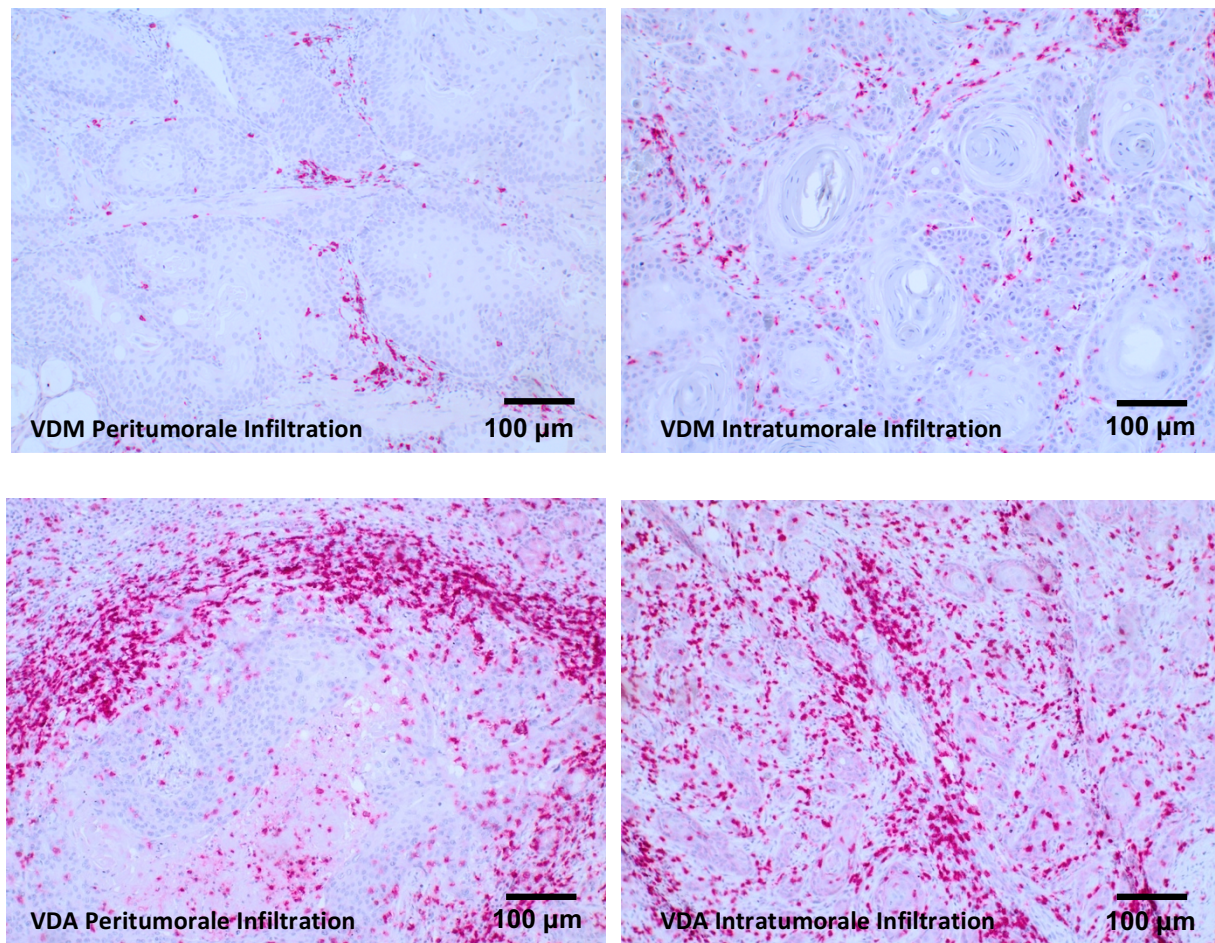
Der Median für das VDM-Kollektiv betrug 1,75, während der Median für das VDH-Kollektiv 4,125 annahm.



**Abbildung 15:** Statistische Auswertung der peritumoralen und intratumoralen Infiltration von T-Helferzellen. Die Infiltration in den Tumor oder die peritumorale Zone wurde mithilfe eines modifizierten IRS bewertet und in Boxplots dargestellt. Jede Box stellt den Interquartilsabstand dar, der Median wird durch eine Linie angezeigt. Die Whisker stellen maximal den 1,5-fachen Interquartilsabstand dar (nach Tukey). Es wurden jeweils Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (grau) mit Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung miteinander verglichen.

## 4. Ergebnisse

### 4.3.2 Ergebnisse der CD8-Immunhistochemie bei HNSCCs



**Abbildung 16:** Tumorspezifische Infiltration mit Immunzellen. Repräsentative immunhistochemische Färbungen CD8-positiver Zellen in einem Mundbodenkarzinom eines Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel und ausreichender Vitamin-D-Versorgung. Es ist jeweils eine peritumorale Infiltration und eine intratumorale Infiltration dargestellt.

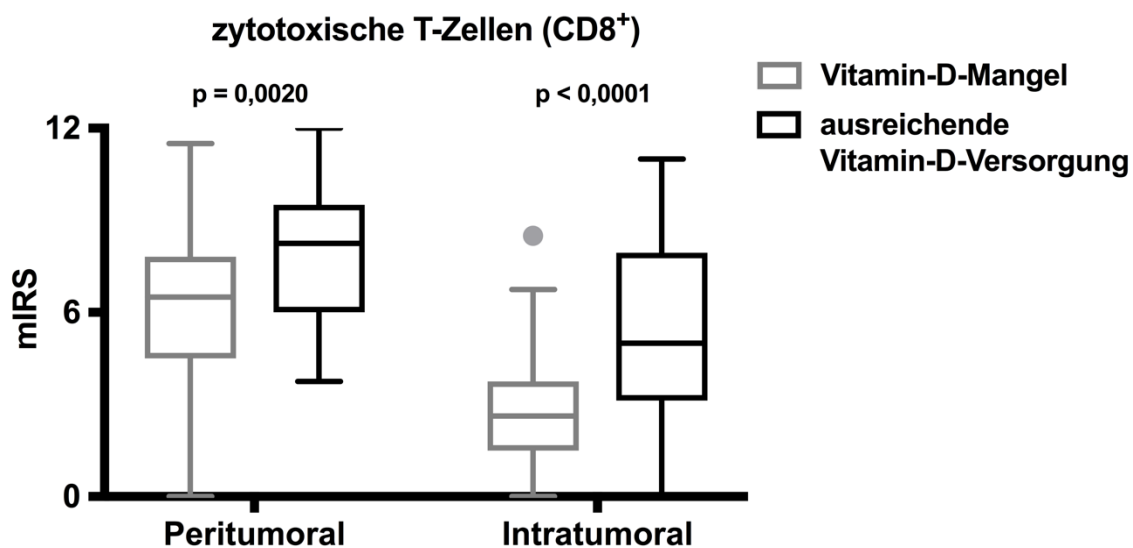
Abbildung 16 zeigt exemplarische Färbungen CD8-positiver Zellen bei einem Patienten mit Vitamin-D-Mangel (VDM) und einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung (VDA), jeweils für eine peri- und intratumorale Infiltration. Die vom Antikörper gefärbten Zellen sind in Rot zu erkennen, das Plattenepithelkarzinom kennzeichnet sich durch invasives Wachstum und Bildung von Tumorzellinseln oder Tumorzellsträngen. Es ist deutlich zu sehen, dass die Färbungen der Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung mehr gefärbte Zellen zeigten als die Färbungen der Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel.

In Abbildung 17 ist die Infiltration mit zytotoxischen T-Zellen (CD8<sup>+</sup>) dargestellt. Auf der linken Seite sieht man die peritumorale Infiltration, auf der rechten Seite die intratumorale Infiltration. Jeweils in Grau ist das Patientenkollektiv mit einem Vitamin-D-Mangel dargestellt, in Schwarz das Patientenkollektiv mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung. Auf der y-Achse ist der modifizierte immunreaktive Score aufgetragen.

## 4. Ergebnisse

Die peritumorale Infiltration mit zytotoxischen T-Zellen war signifikant erhöht bei den Patienten, die eine ausreichende Vitamin-D-Versorgung haben, im Vergleich zu den Patienten, die einen Vitamin-D-Mangel hatten ( $p = 0,0020$ ). Der Mittelwert lag hier bei dem VDM-Kollektiv bei 6,272 mit einem Standardfehler von 0,33 und bei dem VDH-Kollektiv bei 7,8 mit einem Standardfehler von 0,34.

Die intratumorale Infiltration war bei Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung deutlich ausgeprägter als bei Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel. Das Ergebnis war statistisch hochsignifikant ( $p < 0,0001$ ). Der Median für das VDM-Kollektiv betrug 2,625 und für das VDH-Kollektiv 5.

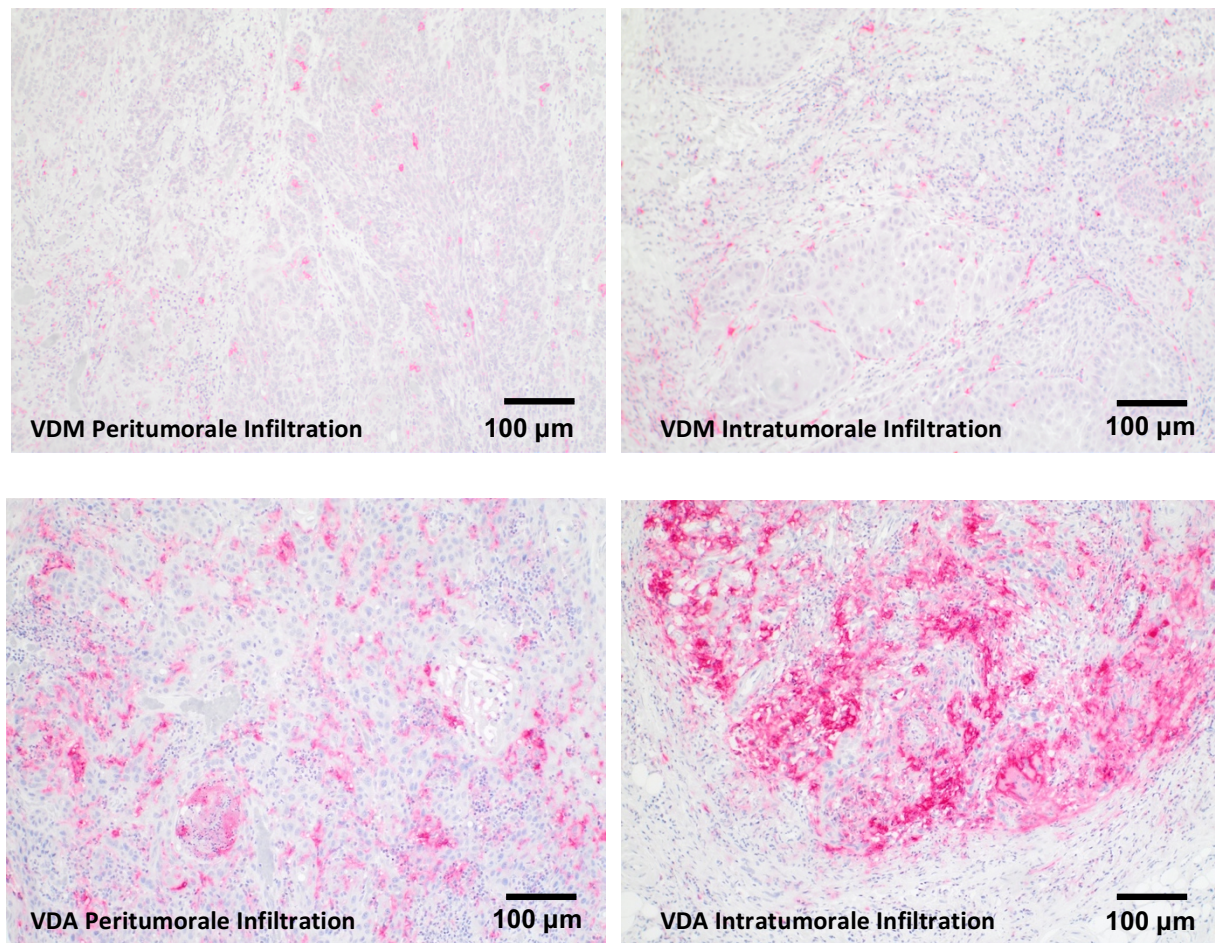


**Abbildung 17:** Statistische Auswertung der peritumoralen und intratumoralen Infiltration von zytotoxischen T-Zellen (CD8<sup>+</sup>). Die Infiltration in den Tumor oder die peritumorale Zone wurde mithilfe eines modifizierten IRS bewertet und in Boxplots dargestellt. Jede Box stellt den Interquartilsabstand dar, der Median wird durch eine Linie angezeigt. Die Whisker stellen maximal den 1,5-fachen Interquartilsabstand dar (nach Tukey). Es wurden jeweils Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (grau) mit Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung (schwarz) miteinander verglichen.



## 4. Ergebnisse

### 4.3.3 Ergebnisse der CD11c-Immunhistochemie bei HNSCCs



**Abbildung 18:** Tumorspezifische Infiltration mit Immunzellen. Repräsentative immunhistochemische Färbungen CD11c-positiver Zellen jeweils eines Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel und ausreichender Vitamin-D-Versorgung. Es ist jeweils eine peritumorale Infiltration und eine intratumorale Infiltration dargestellt.

Abbildung 18 zeigt vier Bilder, die beispielhaft die Färbungen mithilfe der CD11c-Antikörper (M1-Makrophagen) darstellen. Man sieht die peri- und intratumorale Infiltration sowohl für einen beispielhaft ausgewählten Patienten mit Vitamin-D-Mangel als auch für einen beispielhaft ausgewählten Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung. Es fällt auf, dass sich bei ausreichender Vitamin-Versorgung eine deutlich stärkere Immunzellinfiltration zeigt als bei Vitamin-D-Mangel. Dieser Eindruck wird auch in der Statistik bestätigt.

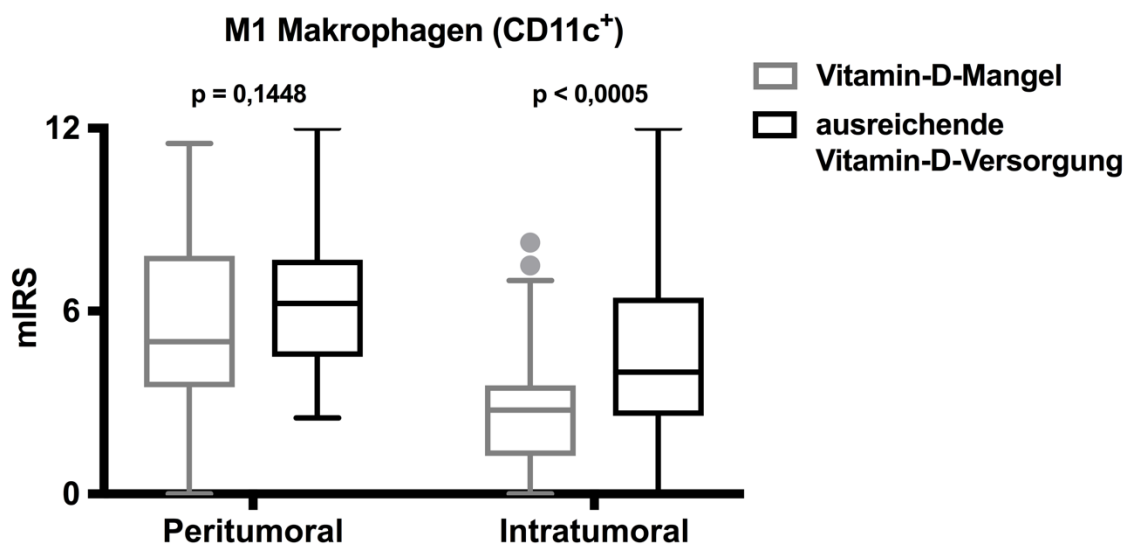
In Abbildung 19 ist die statistische Auswertung der CD11c-Immunhistochemie dargestellt. Auf der linken Seite dargestellt ist die peritumorale Infiltration, auf der rechten Seite die intratumorale Infiltration. Jeweils in Grau ist das Patientenkollektiv mit einem Vitamin-D-Mangel aufgezeichnet, in Schwarz das Patientenkollektiv mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung. Auf der y-Achse ist der modifizierte immunreaktive Score (mIRS) aufgetragen.

#### 4. Ergebnisse

Bei der peritumoralen Infiltration gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen dem VDM- und dem VDH-Kollektiv ( $p = 0,1448$ ). Der Mittelwert betrug 5,496 für das VDM-Kollektiv mit einem Standardfehler von 0,3766 und für das VDH-Kollektiv 6,142 mit einem Standardfehler von 0,35.

Die intratumorale Infiltration war bei Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung deutlich ausgeprägter als bei Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel. Das Ergebnis war statistisch signifikant ( $p < 0,0005$ ).

Der Mittelwert für das VDM-Kollektiv betrug 2,855 mit einem Standardfehler von 0,27 und für das VDH-Kollektiv 4,6 mit einem Standardfehler von 0,43.

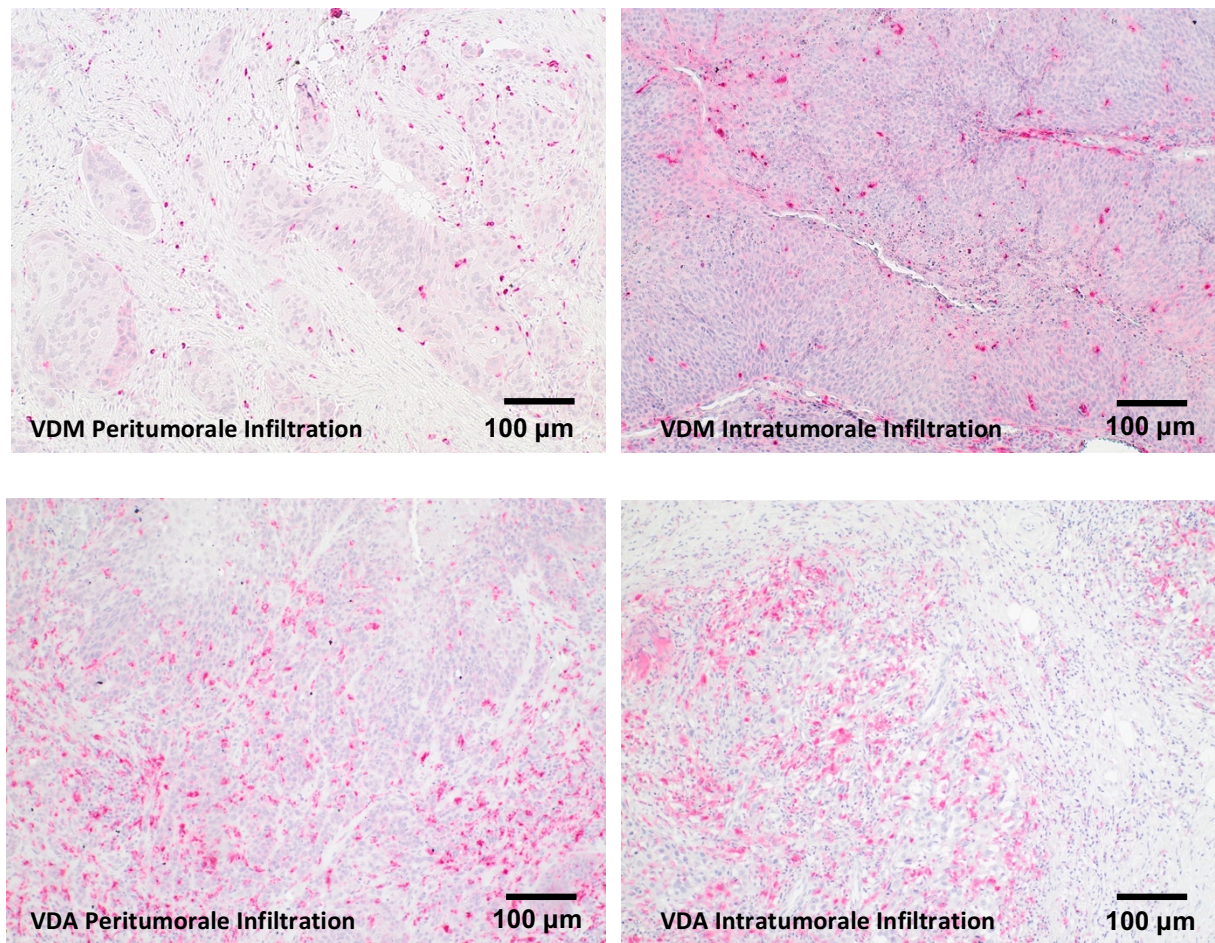


**Abbildung 19:** Statistische Auswertung der peritumoralen und intratumoralen Infiltration von M1-Makrophagen (CD11c<sup>+</sup>). Die Infiltration in den Tumor oder die peritumorale Zone wurde mithilfe eines modifizierten IRS bewertet und in Boxplots dargestellt. Jede Box stellt den Interquartilsabstand dar, der Median wird durch eine Linie angezeigt. Die Whisker stellen maximal den 1,5-fachen Interquartilsabstand dar (nach Tukey). Es wurden jeweils Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (grau) einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung miteinander verglichen.



## 4. Ergebnisse

### 4.3.4 Ergebnisse der CD68-Immunhistochemie bei HNSCCs



**Abbildung. 20:** Tumorspezifische Infiltration mit Immunzellen. Repräsentative immunhistochemische Färbungen CD68-positiver Zellen eines Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel und ausreichender Vitamin-D-Versorgung. Es ist jeweils eine peritumorale Infiltration und eine intratumorale Infiltration dargestellt.

Die Färbungen aller Makrophagen (M1- und M2-Makrophagen) mithilfe des CD68-Antikörpers sind in Beispielen in Abbildung 20 dargestellt. Auch hier kann man erkennen, dass die Bilder der beispielhaft ausgewählten Patienten mit einem ausreichenden Vitamin-D-Spiegel deutlich mehr gefärbte Makrophagen zeigen als die Bilder der beispielhaft ausgewählten Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel.

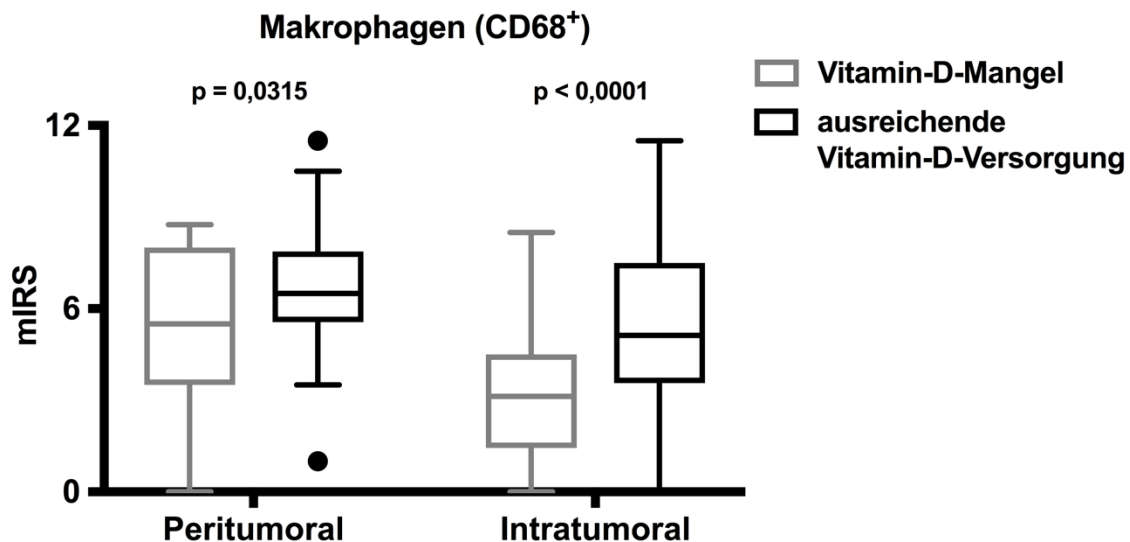
In Abbildung 21 ist die statistische Auswertung der Infiltration mit Makrophagen (CD68<sup>+</sup>) dargestellt. Auf der linken Seite sieht man die peritumorale Infiltration, auf der rechten Seite die intratumorale Infiltration. Jeweils in Grau ist das Patientenkollektiv mit einem Vitamin-D-Mangel aufgezeichnet, in Schwarz das Patientenkollektiv mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung. Auf der y-Achse ist der modifizierte immunreaktive Score aufgetragen.

Die peritumorale Infiltration von Makrophagen in die peritumorale Zone zeigte deutliche Tendenzen zu einer positiven Korrelation zwischen einem erhöhten Vitamin-D-Serumspiegel

#### 4. Ergebnisse

und einer vermehrten Infiltration, war aber statistisch knapp nicht signifikant ( $p = 0,0315$ ). Der Median für das VDM-Kollektiv betrug 5,5 und für das VDH-Kollektiv 6,5.

Die intratumorale Infiltration von Makrophagen war bei einem ausreichenden Vitamin-D-Serumspiegel hoch signifikant erhöht im Vergleich zu dem Patientenkollektiv mit einem Vitamin-D-Mangel ( $p < 0,0001$ ). Der Mittelwert betrug für das VDM-Kollektiv 3,1 mit einem Standardfehler von 0,28 und für das VDH-Kollektiv 5,33 mit einem Standardfehler von 0,41.

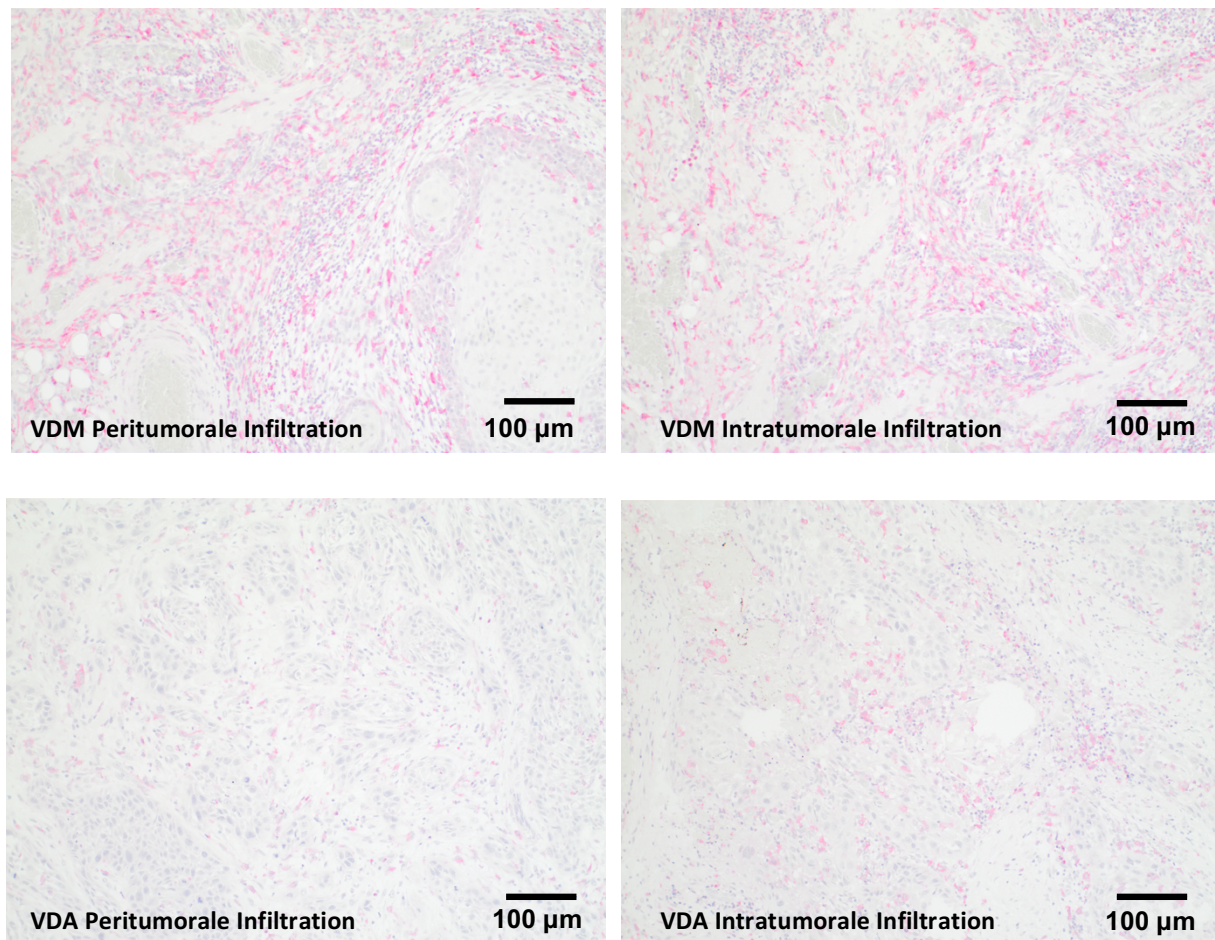


**Abbildung 21:** Statistische Auswertung der peritumoralen und intratumoralen Infiltration von M1- und M2-Makrophagen (CD68<sup>+</sup>). Die Infiltration in den Tumor oder die peritumorale Zone wurde mithilfe eines modifizierten IRS bewertet und in Boxplots dargestellt. Jede Box stellt den Interquartilsabstand dar, der Median wird durch eine Linie angezeigt. Die Whisker stellen maximal den 1,5-fachen Interquartilsabstand dar (nach Tukey). Es wurden jeweils Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (grau) und einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung miteinander verglichen.



## 4. Ergebnisse

### 4.3.5 Ergebnisse der CD163-Immunhistochemie bei HNSCCs



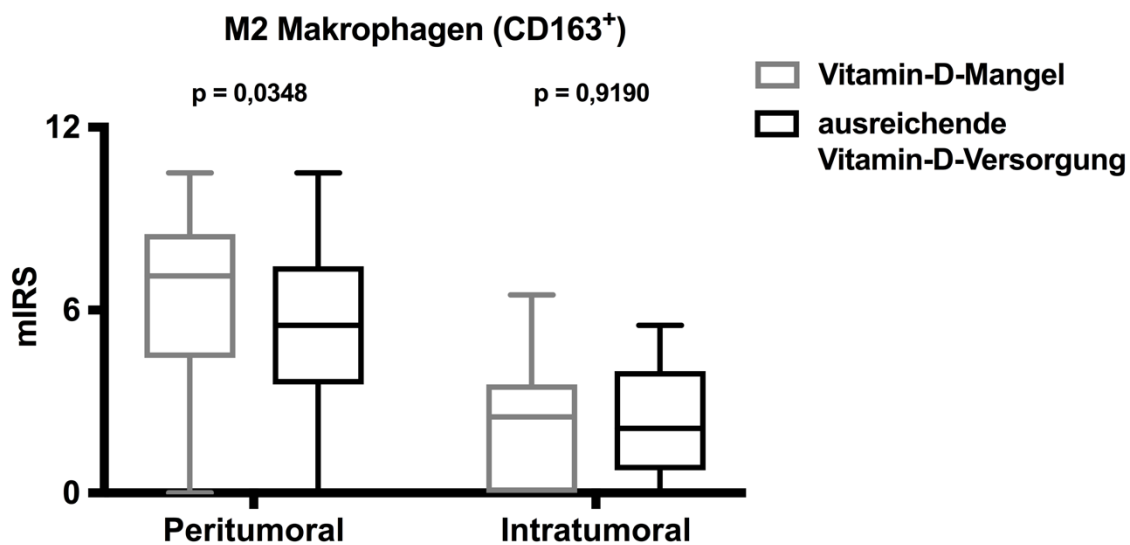
**Abbildung 22:** Tumorspezifische Infiltration mit Immunzellen. Repräsentative immunhistochemische Färbungen CD163-positiver Zellen eines Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel und ausreichender Vitamin-D-Versorgung. Es ist jeweils eine peritumorale Infiltration und eine intratumorale Infiltration dargestellt.

Abbildung 22 zeigt exemplarische Abbildungen der Färbungen, die mithilfe des CD163-Antikörpers durchgeführt wurden. Hier zeigt sich ein, im Vergleich zu den anderen bisher besprochenen Färbungen, gegensätzliches Bild, welches sich auch in der Statistik widerspiegelt. Es sind, wie an den Beispielbildern in Abbildung 22 zu sehen, bei dem beispielhaft ausgewählten Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel mehr Zellen gefärbt als bei dem beispielhaft ausgewählten Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung.

In Abbildung 23 ist die statistische Auswertung der Infiltration mit M2-Makrophagen (CD163<sup>+</sup>) dargestellt. Auf der linken Seite sieht man die peritumorale Infiltration, auf der rechten Seite die intratumorale Infiltration. Jeweils in Grau ist das Patientenkollektiv mit einem Vitamin-D-Mangel aufgezeichnet, in Schwarz das Patientenkollektiv mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung. Auf der y-Achse ist der modifizierte immunreaktive Score aufgetragen.

## 4. Ergebnisse

Die Färbung mit dem CD163<sup>+</sup>-Antikörper zeigte ein von den anderen Antikörpern verschiedenes Ergebnis. Die peritumorale Infiltration war bei Vitamin-D-Mangel statistisch signifikant stärker ausgeprägt als bei einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung ( $p = 0,0348$ ). Der Median betrug 7,1 für das VDM-Kollektiv und 5,5 für das VDH-Kollektiv. Bei der intratumoralen Infiltration gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen der VDH-Gruppe und der VDM-Gruppe ( $p = 0,9190$ ). Der Median betrug hier 2,5 für das Kollektiv mit einem Vitamin-D-Mangel und 2,1 für das Kollektiv mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung.



**Abbildung 23:** Statistische Auswertung der peritumoralen und intratumoralen Infiltration von M2-Makrophagen (CD163<sup>+</sup>). Die Infiltration in den Tumor oder die peritumorale Zone wurde mithilfe eines modifizierten IRS bewertet und in Boxplots dargestellt. Jede Box stellt den Interquartilsabstand dar, der Median wird durch eine Linie angezeigt. Die Whisker stellen maximal den 1,5-fachen Interquartilsabstand dar (nach Tukey). Es wurden jeweils Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (grau) und einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung miteinander verglichen.

### 4.4 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse

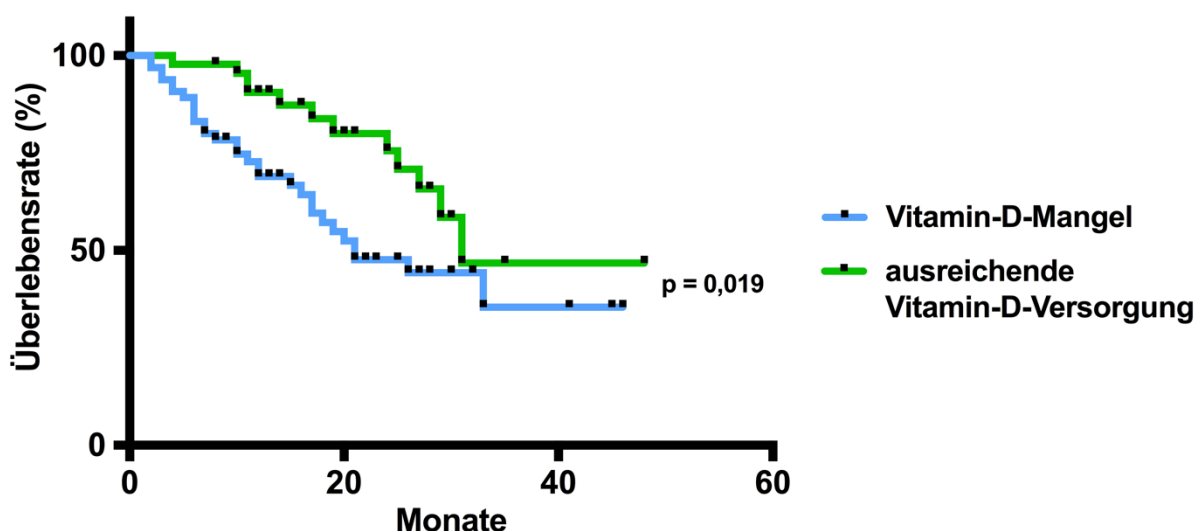
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Lymphozyten- und M1-Makrophagenpopulation (angefärbt mit den gegen CD4, CD8, CD11c und CD68 gerichteten Antikörpern) eine sehr deutliche Tendenz zeigten, bei einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung in stärkerem Maße in den Tumor und in die Tumorrandbereiche zu infiltrieren. Gerade die intratumorale Infiltration wurde durch eine ausreichende Versorgung mit Vitamin D signifikant unterstützt.

Als Ausnahme ist die M2-Makrophagenpopulation zu nennen, welche exemplarisch durch einen CD163<sup>+</sup>-Antikörper dargestellt wurde. Diese zeigte nahezu gegensätzliche Ergebnisse.

Die peritumorale Infiltration war bei Vitamin-D-Mangel verbessert und bei einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung verschlechtert. In Bezug auf die intratumorale Infiltration ließen sich keine Unterschiede zwischen den beiden Kollektiven finden. Die Tendenz geht aber wie auch bei der peritumoralen Infiltration zu einer verbesserten M2-Makrophageninfiltration bei einem Vitamin-D-Mangel.

### 4.5 Überlebensanalyse

In der Kaplan-Meier-Überlebenskurve wird deutlich, dass es bei einem ausreichenden Vitamin-D-Spiegel nicht nur zu einer verstärkten Immunzellinfiltration in den Tumor kommt, sondern dass dieser auch zu einem verbesserten Gesamtüberleben führt. Das mediane Überleben lag bei den Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel bei 21 Monaten, während Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung im Schnitt 10 Monate länger lebten (Median: 31 Monate). Die Hazard Ratio (Mantel-Haenszel) war bei den Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel 2,01 und bei den Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung 0,48. Dementsprechend war das Sterberisiko für Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich bei gleichzeitig bestehendem Vitamin-D-Mangel um 150 % erhöht im Vergleich zu den Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung.



**Abbildung 24:** Überlebensanalyse des untersuchten Patientenkollektivs nach Kaplan-Meier für die Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (blaue Kurve) und die Patienten mit ausreichender Vitamin-D-Versorgung (grüne Kurve;  $p = 0,019$ ; log-rank Test). Schwarze Punkte repräsentieren zensierte Daten.

### 5. Diskussion

Bösartige Tumorerkrankungen sind die zweithäufigste Todesursache in Deutschland nach den Kreislauferkrankungen und stellen auch weltweit das Gesundheitssystem vor eine große Herausforderung. Aufgrund des demografischen Wandels ist zu erwarten, dass die Tumorzinzidenz in den kommenden Jahren noch weiter zunehmen wird (Kaatsch et al. 2015; Gaber & Wildner 2011). Bei den Tumorerkrankungen in Deutschland ist das Prostatakarzinom bei den Männern der häufigste Tumor, die Frauen sind in erster Linie von Brustdrüsenkrebs betroffen. Tumorerkrankungen des Kopf-Hals-Bereichs stehen an fünfter Stelle, wobei Frauen deutlich seltener betroffen sind als Männer. Aufgrund des in den vergangenen Jahren zunehmenden Nikotinkonsums von Frauen wird aber auch hier ein Anstieg erwartet (Kaatsch et al. 2015).

Trotz aller Bemühungen in der Forschung und in der klinischen Entwicklung ist die Behandlung von Kopf-Hals-Karzinomen ausgesprochen schwierig. Dies liegt zum einen an dem oft schon fortgeschrittenen Tumorstadium der Patienten zum Zeitpunkt der Erstvorstellung und zum anderen an der molekularen wie auch klinischen Heterogenität der Tumoren (Gerlinger et al. 2012). Zudem besitzt der Tumor Möglichkeiten, das körpereigene Immunsystem auf noch nicht vollständig verstandene Art und Weise zu umgehen (Beatty & Gladney 2015; Burnet 1970; Thomas 1982). Diese Faktoren machen die Behandlung dieser Tumoren sehr komplex und haben zur Folge, dass die 5-Jahres-Überlebensrate bei Kopf-Hals-Tumoren seit vielen Jahrzehnten nahezu unverändert bei 50-60 % liegt (Kaatsch et al. 2015).

Zur Behandlung der Tumoren stehen als Optionen die chirurgische Therapie, die Radiotherapie und die Chemotherapie sowie seit wenigen Jahren die Antikörpertherapie mit dem EGFR-Antikörper Cetuximab zur Verfügung. Diese können je nach Tumorstadium kombiniert oder einzeln eingesetzt werden (Pezzutto et al. 2007; Schmoll et al. 2013). Allerdings sind diese Therapieoptionen bei fortgeschrittenen Tumoren häufig nur eingeschränkt wirksam und weisen zudem eine ausgeprägte Toxizität bzw. die Lebensqualität der Patienten einschränkende Langzeitfolgen auf, da eine Chemo- oder Strahlentherapie nicht ausschließlich den Tumor bekämpft, sondern auch gesunde Zellen des Körpers schädigt (Young & Day 2013) sowie eine chirurgische Therapie das Schlucken und das Sprechen der Patienten erschweren kann. Um solche Therapieprobleme zu vermeiden und ein besseres Überleben für den Patienten garantieren zu können, muss nach neuen Methoden gesucht werden, um den Krebs zu bekämpfen und die Nebenwirkungen einer Therapie zu reduzieren.



Diese Faktoren in einen Konsens zu bringen, ist Gegenstand der aktuellen Forschung und lenkt den Blick auf das körpereigene Tumorabwehrsystem.

Als eine Option wird in diesem Kontext die Immunmodulation gesehen (Fenichel & Chirigos 1984). Diese Annahme basiert auf einer Hypothese, die erstmals Burnett und Thomas aufgestellt haben und die davon ausgeht, dass die Tumorentwicklung, das sogenannte „Immunoediting“, aus drei verschiedenen Stadien besteht (Burnet 1970; Thomas 1982). Stadium 1 ist die Elimination des Tumors von dem Immunsystem, Stadium 2 das Gleichgewicht zwischen Tumor und Immunsystem und Stadium 3 das Entkommen des Tumors vor dem Immunsystem („Immunescape“). Das Tumorwachstum kann nur dann stattfinden, wenn diese 3 Stadien überwunden wurden. Dazu greift der Tumor auf verschiedene Strategien zurück. Diese sind gekennzeichnet durch die Reduzierung der eigenen Immunogenität, der Produktion immunsuppressiver Moleküle und der Förderung immunregulierender Komponenten (Burnet 1970). Neue Therapieansätze auf dem Gebiet der Tumورimmunologie zielen daher darauf ab, tumorfördernde Komponenten des Immunsystems zu neutralisieren und tumorhemmende Anteile des Immunsystems zu stärken. Ziel ist es, eine effektive immunologische Tumorantwort zu generieren (Kansy et al. 2015). Dazu ist es wichtig zu wissen, welche Komponenten des Immunsystems eine Tumorentstehung verhindern bzw. eine Tumorprogression aktiv bekämpfen können.

Die natürliche Tumorabwehr wird durch verschiedene Immunzellen gefördert. Hierzu zählen B- und T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und dendritische Zellen (DC). Die B-Zellen produzieren nach einer Tumorantigen-abhängigen T-Zellaktivierung Antikörper. Es wurden Antikörper bei Patienten nach Diagnose mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich gegen p53, MUC1, p40, p7 sowie HPV-E6 und -E7 nachgewiesen (Zumbach et al. 2000). Eine wichtige Rolle spielen dabei auch die MHC-Proteine auf den Zelloberflächen. MHC-I-Moleküle werden von jeder körpereigenen Zelle exprimiert, wohingegen MHC-II-Moleküle nur von antigenpräsentierenden Zellen wie beispielsweise DCs oder Makrophagen exprimiert werden. CD8<sup>+</sup>-T-Effektorzellen, welche für die Tumorlyse verantwortlich sind, werden durch Antigenpräsentation via MHC-I aktiviert, CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen über eine MHC-II-ausgelöste Antigenpräsentation. Weiterhin spielen verschiedene Interleukine wie IL-12, IL-18 und IL-2 sowie der Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha (TNF $\alpha$ ) eine wichtige Rolle bei der Tumorabwehr. Sie werden hauptsächlich durch die TH1-Zellen sezerniert. Der TH2-Subtyp der CD4<sup>+</sup>-Zellen hingegen fördert das Tumorwachstum durch eine Sezernierung von IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 (Löffler & Petrides 2013;

Kansy et al. 2015). Um das Immunsystem zu umgehen, haben Kopf-Hals-Tumoren nun jedoch Mechanismen entwickelt, um einer steten Aktivierung der Effektorzellen zu entgehen und so eine hohe antitumorale Aktivität des Immunsystems zu verhindern. Für regulatorische T-Zellen (Tregs), Supressorzellen myeloiden Ursprungs und tumorassoziierte Makrophagen ist in verschiedenen Untersuchungen gezeigt worden, dass sie den Tumor in seiner Entwicklung unterstützen (Alhamarneh et al. 2008; Chikamatsu et al. 2007; Badoual et al. 2006). Die zuvor dargestellten Forschungsergebnisse zeigen, dass es vielfältige Komponenten des Immunsystems gibt, die Einfluss auf die Tumorabwehr haben und Ansatz einer immunonkologischen Therapie sein können.

So werden in verschiedenen klinischen und experimentellen Studien unterschiedliche Ansätze untersucht. Dazu zählen Zytokintherapien, welche die inhibierenden Zytokine wie VEGF unterdrücken sollen (Enk et al. 2000), Toll-like-Rezeptor-Stimulationen, die eine Immunantwort verstärken und so eine Abwehrreaktion triggern sollen (Okamoto et al. 2006), Vakzinierungen, die sich auf die steigende Zahl der HPV-positiven Patienten beziehen, (Ramqvist & Dalianis 2010) und Checkpointinhibitorthérapien (Hodi et al. 2010).

Die Komplexität des Immunsystems und die des Tumors erschweren dabei die Herstellung eines geeigneten Medikaments. Betrachtet man einzelne zugelassene Medikamente zur Tumorbekämpfung, so ergibt sich ein heterogenes Bild in Bezug auf die Wirkung und Anwendbarkeit (Okamoto et al. 2006). Der Toll-like-Rezeptor Stimulator Picibanil (OK-432), für den eine Zulassung bei Kopf-Hals-Tumorpatienten angestrebt wurde, soll eine Immunantwort über die Stimulation von TLR-4-Rezeptoren hervorrufen und so die Immunzellen im Bereich des Tumors aktivieren. Studien haben allerdings gezeigt, dass eine Tumorabwehr nicht sicher nachgewiesen werden kann. Das Medikament wurde folglich nicht zugelassen (Okamoto et al. 2006). Hinzu kommt, dass ein zugelassenes Medikament zur Tumorthérapie nicht grundsätzlich auch eine Wirksamkeit bei allen Tumoren zeigt, da der genaue Mechanismus der Wirkung häufig nicht vollständig untersucht ist oder der Tumor dem Medikament aufgrund der spezifischen Expression bestimmter Oberflächenmoleküle keine Angriffsfläche bietet. Ipilimumab ist ein CTLA4-Antikörper, der inhibitorische Signalwege der Immunzellen blockieren soll (sog. Checkpoint-Inhibitor). Er wurde im März 2011 als erster monoklonaler Antikörper zur Therapie des multiplen Melanoms zugelassen und konnte das Überleben der Patienten signifikant verbessern (Kansy et al. 2015). Derzeit werden Studien an Kopf-Hals- und Prostata Tumoren durchgeführt (Kansy et al. 2015). Das ebenfalls zu der Gruppe der Checkpointinhibitoren zählende Nivolumab ist ein Anti-PDL1-

Antikörper, welcher den Immunescape des Tumors mithilfe einer Blockade des PD-1-Rezeptors blocken soll. In einer Studie von 107 Patienten mit einem fortgeschrittenen Kopf-Hals-Karzinom zeigte ein Viertel der Patienten einen objektiven Tumorregress und ein weiteres Viertel eine „stable disease“ (Beatty & Gladney 2015; Kansy et al. 2015; Bann et al. 2016). Seit April 2017 ist Nivolumab auch in Europa zur Therapie von Platin-refraktären Kopf-Hals-Tumoren zugelassen.

Diese Beispiele zeigen, dass es zahlreiche vielversprechende Ansätze gibt, Tumoren mithilfe der Immunmodulation zu bekämpfen. Allerdings gibt es auch bei der Immuntherapie Probleme. Zum einen sind die derzeitigen Medikamente nur bei bestimmten Tumorentitäten und Lokalisationen zugelassen, teilweise auch nur in Kombination mit einer Chemotherapie und/oder Strahlentherapie, was die Zahl der Patienten, bei denen diese Therapeutika tatsächlich eingesetzt werden können, sehr einschränkt. Zum anderen stehen sehr viele Ansätze noch am Anfang der Entwicklung und benötigen noch einige Zeit, um etabliert zu werden und Einzug in den klinischen Alltag zu finden. Außerdem stellt ein Immunmodulator derzeit nur in Einzelfällen eine Möglichkeit zur kompletten Remission der Tumorerkrankung dar. Außerdem besitzen Checkpointinhibitoren Nebenwirkungen, die nicht zu unterschätzen sind. Hierzu zählen die Autoimmunhepatitis, die Autoimmunpneumonitis, die Autoimmuncolitis und die Autoimmunhypophysitis. Diese Nebenwirkungen führen häufig zum Abbruch der Therapie (Schadendorf 2015).

Ein weiteres Problem ist, dass alle Tumorthérapien erst dann begonnen werden, wenn der Krebs klinisch nachweisbar ist. Dieser Zeitpunkt ist allerdings in Hinsicht auf eine möglichst effektive Immunmodulation häufig viel zu spät, da die oben genannten Prozesse des Immunoediting schon abgelaufen sind und der Tumor das Immunsystem bereits umgangen hat. Verschiedene Studien gehen davon aus, dass die Vorläuferzellen eines Karzinoms schon Jahre vorher im Organismus vorhanden sind und die Entstehung eines Tumors induzieren (Cowell 2001). Dies wäre eigentlich der effektivste Zeitpunkt, um den Tumor schon in einem frühen Stadium der Karzinogenese anzugreifen und ihn beseitigen zu können. Allerdings ist eine Diagnose solcher Vorläuferzellen mit der heutigen Technik noch nicht möglich. Dazu kommt, dass eine Primärprävention bei einem Menschen bei den heutigen Kosten einer Immuntherapie ohne gesicherte Beweislage einer veränderten Struktur im Körper nicht ökonomisch realisierbar wäre. Aus diesem Grund ist es von elementarer Bedeutung, dass das Immunsystem in allen Stadien des Lebens gestärkt wird, um so eine möglichst direkte

Abwehr und eine Primärprävention von Tumorerkrankungen zu unterstützen. Es stellt sich die Frage, welche Substanz diese Kriterien erfüllt.

Um dem Patienten in Zukunft eine möglichst gute Therapie anbieten zu können, muss die Forschung vorangetrieben werden. Dabei ist es auch wichtig, sich nicht nur auf exogene Maßnahmen zu konzentrieren, sondern auch nach Möglichkeiten zu suchen, die das körpereigene Abwehrsystem spezifisch bei der Tumorabwehr unterstützen können. Ein weiteres Ziel ist es, die Tumorzinzidenz zu reduzieren. Hierbei ist eine Primärprävention nötig. Diese beginnt bei der Aufklärung über den Konsum von kanzerogenen Substanzen wie Nikotin und Alkohol und geht über in eine früh beginnende Immunsystemstärkung.

Die Schnittstelle zwischen einer medikamentösen, exogenen Immunmodulation und einer endogenen Stimulation des Immunsystems könnte das Vitamin D darstellen. Vitamin D hat als potenzielles Tumorthapeutikum verschiedene Vorteile. In unterschiedlichen Studien konnte belegt werden, dass Immunzellen einen Vitamin-D-Rezeptor besitzen und Vitamin D bei einem ausreichenden Spiegel im Blut Einfluss auf die Funktion der Immunzellen nimmt (Dörr et al. 2012; Bouillon et al. 2008; Zella et al. 2003; Nnoaham & Clarke 2008; Simpson et al. 2010; Kongsbak et al. 2014). Interessant ist dieser Aspekt auch bei der Betrachtung von Kopf-Hals-Tumoren, welche im Vergleich zu anderen Körperregionen durch die anatomischen Gegebenheiten wie zum Beispiel die Nähe zu den lymphatischen Strukturen des Waldeyerschen Rachenrings mehr Leukozyten aufweisen. Es konnte in Studien bereits bestätigt werden, dass sich ein ausreichender Vitamin-D-Spiegel positiv auf kardiovaskuläre Erkrankungen, autoimmune Prozesse und hormonale Regelkreise auswirkt (Zittermann 2006; Garland et al. 2008; Black & Scragg 2005; Camargo et al. 2006; Holick 2005; Zhou 2006). Betrachtet man die in Studien nachgewiesenen Auswirkungen von Vitamin D auf das angeborene und das erworbene Immunsystem, so kann man unter Berücksichtigung des Tumorescape-Mechanismus darauf schließen, dass Vitamin D die Tumorabwehr unterstützen kann. Diese Annahme wird durch einige bereits durchgeführte Studien unterstützt. Diese belegen, dass Menschen mit einem Vitamin-D-Spiegel, der um 25 nmol/L gesteigert wird, eine um 17 % verringerte Krebsinzidenz aufweisen und das Vitamin D nachweisbar das Krebsrisiko von gastrointestinalen Tumoren verhindern kann (Giovannucci et al. 2006; Garland et al. 2006). In einer neuern Studie konnte sogar die Assoziation zwischen genotypischen Polymorphismen die sich auf das Gen GC 4588, welches ein Vitamin D Bindungsprotein darstellt, den Vitamin-D-Spiegel und dessen unterstützende Wirkung mit Cetuximab bei der Behandlung von metastasierten Kolonkarzinomen hergestellt werden

(Berger et al. 2017). Diese Studien haben unter anderem dazu beigetragen, dass Vitamin D an der Universität des Saarlandes bei Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel substituiert wird. Hinzu kommt, dass Vitamin D eine Substanz ist, die vom Körper selbst gebildet wird und dementsprechend, bei physiologischer Dosierung, keine Nebenwirkungen zeigt (Löffler & Petrides 2013). Darüber hinaus ist Vitamin D im Vergleich zu anderen Medikamenten vergleichsweise günstig. Eine Packung Vitamin D3 kostet ca. 8 Euro bei einer Packungsgröße von 200 Tabletten mit je 1000 I.E (z. B. Vigantolekten® des Pharmaherstellers Merck). Diese Tatsache macht die therapeutischen Effekte auch für Länder interessant, in denen das Gesundheitssystem nicht so ausgeprägt organisiert und finanziert ist wie in den westlichen Industrienationen. Unterstützt wird diese Annahme von einer kürzlich erschienenen Metaanalyse aus dem British Journal of Cancer (n = 44.165, 64 Studien), die ebenfalls zu dem Schluss kommt, dass ein höherer Vitamin-D-Spiegel zu einem besseren Gesamtüberleben bei einem Tumorleiden (Hazard Ratio: 0,74) führt (Vaughan-Shaw et al. 2017). In dieser Studie wurden neben 13 weiteren Tumorentitäten auch Studien zur prognostischen Relevanz des Vitamin-D-Serumspiegels bei Kopf-Hals-Tumorpatienten untersucht.

Einschränkend muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass einzelne Studien auch keine prognostische Relevanz des Vitamin-D-Serumspiegels bei Kopf-Hals-Tumorpatienten nachweisen konnten. Im Folgenden soll daher auf diese Studien näher eingegangen werden. Zum einen sei hier die Studie von (Meyer et al. 2011) erwähnt die bei 540 Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor (Plattenepithelkarzinome, Sarkome, Adenokarzinome) die Rezidivraten und das Auftreten von neuen Zweittumoren in Abhängigkeit des Vitamin-Spiegels und der Ernährung untersucht hat und zu dem Schluss gekommen ist, dass Vitamin D keinen Einfluss auf das Outcome der Patienten hat. Auch eine finnische Studie von (Arem et al. 2011) zeigte keinen Einfluss von Vitamin D auf die Erkrankungshäufigkeit bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich. Diesen Ergebnissen stehen hingegen zahlreichen Studien gegenüber die zeigen, dass Vitamin-D einen Einfluss auf die Prognose von malignen Tumoren (Vaughan-Shaw et al. 2017) und einen positiven Einfluss auf die antitumorale Aktivität des Immunsystems hat (Priestl et al. 2013; Young & Day 2013; Baeke, Takiishi, et al. 2010). Diese Diskrepanz der Studienergebnisse lässt sich unter anderem dadurch erklären, dass insbesondere bei einer eingeschränkten Fallzahl die Datenanalyse zahlreichen potentiellen Fehlerquellen unterlegen ist, die nur sehr schwer zu kontrollieren sind. Dazu gehören die Lebensgewohnheiten der Patienten, Nikotinkonsum, Alkoholkonsum, HPV-Status, der geographische Wohnort und die Dauer der Sonnenexposition, die zu einer relevanten Verzerrung der statistischen Datenanalyse und damit auch der Schlussfolgerungen

der Studien führen können. Zudem beziehen sich die oben genannten Studien, die keinen Einfluss von Vitamin D auf die Prognose und Rezidivrate von HNSCC-Patienten gezeigt haben, nur auf retrospektive Daten und schließen keine molekularen Untersuchungen mit ein. Diese sind jedoch erforderlich, um die Wirkungen des Vitamin D auf das Immunsystem zu untersuchen und um die Frage zu beantworten ob und wie Vitamin D einem Tumorpatienten bei der Bewältigung seiner Erkrankung helfen kann.

Diese Arbeit greift die Therapieprobleme die Immuninsuffizienz von Kopf-Hals-Tumorpatienten, die Möglichkeit, das Immunsystem zu unterstützen, und die Rolle des Vitamin D auf und sollte untersuchen, ob Vitamin D einen Einfluss auf die tumorspezifische Immunabwehr hat. Um dies zu überprüfen, wurden verschiedene Antikörper ausgewählt, die die Leukozytenpopulation in der peritumoralen und in der intratumoralen Zone exemplarisch darstellen sollen. Dabei wurde ein Antikörper gegen CD4-positive Zellen verwendet, der in erster Linie die T-Helferzellen nachweisen sollte, ein Antikörper gegen CD8-positive Zellen, der vornehmlich die zytotoxischen T-Zellen nachweisen sollte, ein Antikörper gegen CD11c, der die M1-Makrophagen darstellen sollte, ein Antikörper gegen CD68-positive Zellen, um Makrophagen nachzuweisen, und ein Antikörper gegen CD163-positive Zellen, um die M2-Makrophagen darzustellen. Es wird davon ausgegangen, dass die oben genannten Antikörper in erster Linie die genannten Leukozytenpopulationen darstellen. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass nicht ausschließlich diese Immunzellen gefärbt wurden, da die Oberflächenproteine auf den Immunzellen nicht mit absoluter Sicherheit spezifisch sind. Angewendet wurden die Antikörper bei immunhistochemischen Färbungen der Präparate des Patientenkollektivs. Dieses bestand aus 103 Patienten, wovon 44 Patienten einen Vitamin-D-Mangel und 59 Patienten eine ausreichende Vitamin-D-Versorgung hatten. Im Vorfeld wurde der Vitamin-D-Mangel als Serumkonzentration von weniger als 10 ng/ml und die ausreichende Vitamin-D-Versorgung als mehr als 15 ng/ml festgelegt. Insgesamt wurden so mit Antikörperfärbungen, den Positiv- und Negativkontrollen und den Etablierungsfärbungen ca. 1000 immunhistochemisch gefärbte Präparate angefertigt, die durch drei verschiedene, hinsichtlich der histologischen Diagnose des zu begutachtenden Präparats, der entsprechenden klinischen Daten und der Bewertung durch die anderen Auswerter verblindete Personen, davon ein Facharzt für Pathologie, ausgewertet wurden.

Durch die Versuche konnte eine starke Korrelation zwischen dem Vitamin-D-Serumspiegel und dem Infiltrationsverhalten von Leukozyten in den Tumor sowie in die peritumorale Zone

nachgewiesen werden. Bei den Lymphozyten war dieses Ergebnis sehr einheitlich. Dies gilt in erster Linie für die intratumorale Infiltration. Die Patienten mit einem ausreichenden Vitamin-D-Spiegel hatten im Vergleich zu den Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel eine deutlich gesteigerte T-Helferzelleninfiltration. Dieses Ergebnis war hoch signifikant ( $p < 0,0001$ ). Die peritumorale Infiltration der T-Helferzellen war bei Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung ebenfalls deutlich höher als die der Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel, das Ergebnis war allerdings nicht eindeutig signifikant ( $p < 0,0553$ ), zeigte aber eine klare Tendenz. Die zytotoxischen T-Zellen zeigten intratumoral in gleicher Weise eine deutlich vermehrte Infiltration bei einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung als bei den Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel ( $p < 0,0001$ ). Auch bei der peritumoralen Infiltration zeigten sich bei einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung deutlich mehr zytotoxische T-Zellen im Randbereich des Tumors als bei Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel. Auch dieses Ergebnis war statistisch signifikant ( $p = 0,0020$ ).

Bei den Makrophagen zeigte sich dagegen ein heterogenes Bild. Die Gesamtpopulation der Makrophagen (CD68-positive Zellen) und die M1-Makrophagenpopulation verhielten sich ähnlich wie die Lymphozyten. Intratumoral zeigte sich bei einem ausreichenden Vitamin-D-Spiegel eine signifikant vermehrte Infiltration von M1-Makrophagen ( $p < 0,0005$ ). Peritumoral ließ sich dieser Effekt nicht bestätigen ( $p = 0,1448$ ). Die CD68-positiven Zellen zeigten wie auch die Lymphozyten und die M1-Makrophagen intratumoral eine deutlich vermehrte Infiltration bei einem ausreichenden Vitamin-D-Spiegel ( $p < 0,0001$ ). Die peritumorale Infiltration war nicht signifikant beeinflusst ( $p = 0,0315$ ), zeigte aber eine deutliche Tendenz hin zu einer vermehrten Infiltration bei einem ausreichenden Vitamin-D-Spiegel. Die M2-Makrophagen lieferten ein anderes Ergebnis. Bei einem ausreichenden Vitamin-D-Spiegel zeigte sich peritumoral eine verminderte Infiltration bei einem ausreichenden Vitamin-D-Spiegel ( $p = 0,0348$ ). Auch intratumoral kam es zu keinem signifikanten Unterschied zwischen den Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung und den Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel ( $p = 0,9190$ ).

Diese Ergebnisse könnten unter anderem ein Grund sein, warum die bisher publizierten Studien, wie die von Vaughan und Shaw aus dem Jahr 2017, die die Wirkung des Vitamin D hinsichtlich des Überlebens untersucht haben, zu dem Ergebnis gekommen sind, dass Vitamin D einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf die Prognose des Patienten hat. Im Zusammenhang mit der Studie von Badoual aus dem Jahr 2006, die zu dem Ergebnis kommt, dass eine erhöhte Infiltration von  $CD4^+$ -Zellen in Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-

Bereich auch zu einer verbesserten Prognose führt und der Studie von (Kongsbak et al. 2014) die zeigt, dass die CD4<sup>+</sup>-Zellen durch Vitamin D aktiviert werden und dann selbst in der Lage sind inaktives Vitamin D in aktives Vitamin D zu verwandeln, gibt es Anhaltspunkte die zeigen, dass es zwischen dem Vitamin-D-Spiegel, der Aktivität der Immunzellen und der Prognose bei einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich eine positive Korrelation geben könnte, die durch diese Arbeit unterstützt wird. Um diese Hypothese weiter zu stützen und die molekularen Mechanismen besser verstehen zu können sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

Die einzige Zellpopulation, die in der vorliegenden Arbeit von diesem Schema abweicht, ist die der M2-Makrophagen. Bei einer näheren Betrachtung dieser Makrophagengruppe lassen sich Studien finden, die zeigen, dass M2-Makrophagen vorwiegend immunsuppressiv wirken. Dies würde bedeuten, dass ein ausreichender Vitamin-D-Spiegel die vom Tumor ausgehende Immunsuppression über das vermehrte Rekrutieren von M2-Makrophagen unterdrückt (Guttman & C Lewis 2016; Sica et al. 2015) und so ebenfalls über die Beeinflussung dieser Leukozytenpopulation letztlich eine Immunstimulation erreicht wird.

Es stellt sich ausgehend von diesen Ergebnissen die Frage, über welchen Mechanismus Vitamin D die Tumoralabwehr fördert. Es wäre interessant zu erfahren, wie sich eine Immunzelle gegenüber einem Antigen verhält in Abhängigkeit von einem unterschiedlichen Vitamin-D-Serumspiegel. Des Weiteren bleibt die Frage ungeklärt, wie aktiv die Immunzellen sind, die den Tumor infiltriert haben und wie hoch der Vitamin-D-Serumspiegel sein sollte, damit es zu einem therapeutischen Effekt kommt. Dieser Fragestellung wird aktuell von der onkologischen Arbeitsgruppe der HNO-Klinik der Universität des Saarlands unter Führung von PD Dr. med. M. Linxweiler und Florian Bochen in Form einer Untersuchung zur lytischen Signatur der durch Vitamin D aktivierten Zellen nachgegangen.

In dieser Arbeit wurde davon ausgegangen, dass ein Vitamin-D-Serumspiegel von unter 10 ng/ml einen Vitamin-D-Mangel und ein Vitamin-D-Serumspiegel von über 15 ng/ml eine ausreichende Vitamin-D-Versorgung darstellt. Diese Werte sind, wenn man die Literatur betrachtet, vergleichsweise niedrig angesetzt (Holick 2007). Das Problem bei Kopf-Hals-Tumorpatienten ist, dass man davon ausgehen kann, dass dieses Patientenkollektiv in der Regel einen noch weiter verminderten Vitamin-D-Serumspiegel hat, als er in der Bevölkerung schon vorliegt (Holick 2007; Bittenbring et al. 2014). Hinzu kommen weitere Faktoren, die einen Einfluss auf das Immunsystem haben und bei Kopf-Hals-Tumorpatienten relativ häufig beobachtet werden können. Dazu zählen eine gewisse Affinität zum Nikotin- und



Alkoholkonsum (Ganz & Jahnke 1996) sowie virale Erkrankungen wie eine High-Risk-HPV-Infektion der Schleimhaut (Betioli et al. 2013). Bei der Erfassung der Daten in der vorliegenden Arbeit zeigte sich zumindest bei den HPV-positiven Patienten und den Rauchern kein Überhang auf einer Seite eines Kollektivs (VDM vs. VDA). Auch ein Vergleich der beiden Kollektive hinsichtlich des Body-Mass-Index und des Serumalbumins, zwei Faktoren die den Ernährungszustand der Patienten charakterisieren, ergab keinen Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen. Der Alkoholkonsum lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht auswerten, da einige Angaben dazu unvollständig sind und davon ausgegangen werden kann, dass einige Angaben nicht der Wahrheit entsprechen. Hinzu kommen Parameter, die in dieser Arbeit nicht erfasst wurden. Dazu zählen das soziale Lebensumfeld der Patienten, die Essgewohnheiten, reiseanamnestische Daten sowie Stoffwechselkrankheiten, die Einfluss auf den Vitamin-D-Spiegel haben. Zudem wurde den Patienten über das gesamte Jahr gleichmäßig verteilt Blut abgenommen um den Vitamin-D-Serumspiegel zu bestimmen. Dabei wurde dem VDA-Kollektiv das Blut zu gleichen Teilen in den Sommermonaten (April - September, 53%) als auch in den Wintermonaten (Oktober – März, 47%) abgenommen und dem VDM-Kollektiv mit einem leichten Überhang zum Winter (64%) hin das Blut abgenommen. Durch diese vergleichbare jahreszeitliche Verteilung der Blutentnahmen sollten Einflüsse einer unterschiedlichen Sonnenexposition auf die Studienergebnisse möglichst vermieden werden, wenngleich auf Grund der eingeschränkten Beeinflussbarkeit der Zeitpunkte der Patientenrekrutierung kein perfektes Matching zwischen der VDM- und der VDA-Gruppe erreicht werden konnte.

Um letztlich zu klären, ob Vitamin D einen unabhängigen prognostischen Faktor darstellt und ein von weiteren immunmodulatorischen Elementen unabhängiges immunstimulierendes Potenzial hat, ließe sich nur in einer umfassenden multivarianten Analyse klären, wozu jedoch das Patientenkollektiv, welches die Tumorentität des HNSCCs für das Saarland und angrenzende Bereiche in einem Zeitraum von etwas mehr als eineinhalb Jahren darstellt (ca. 60 HNSCCs werden in der Universität des Saarlandes jährlich behandelt), in der vorliegenden Arbeit zu klein ( $n = 103$ ) und hinsichtlich der Tumorlokalisationen, der Tumorentitäten und der demografischen Charakteristika der Patienten zu heterogen war.

Dennoch zeigt sich bei der Betrachtung der Überlebensdaten des Patientenkollektivs, dass das Kollektiv mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung im Median 10 Monate länger gelebt hat als das Kollektiv der Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel. Dies lässt darauf schließen, dass die signifikante Erhöhung der Leukozyteninfiltration in den Tumor eines

Patienten einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Tumorabwehr hat, der zudem prognostisch relevant zu sein scheint, und die 5-Jahres-Überlebensrate von nur 50 % verbessern könnte.

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten bestärken die Argumentation, dass die Wirkung des Vitamin D in Bezug auf das Immunsystem insbesondere vor dem Hintergrund von Tumorerkrankungen weiter untersucht werden sollte. Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Reduzierung der immunsupprimierenden M2-Makrophagen unter einem ausreichenden Vitamin-D-Spiegel. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass es unter einer ausreichenden Vitamin-D-Verfügbarkeit zu einer Beeinflussung des Tumorescape kommen könnte. Unter der Hypothese, dass das Immunsystem von dem Tumor schon umgangen wurde, bevor erste klinische Zeichen auftreten, lässt sich annehmen, dass eine ausreichende Vitamin-D-Versorgung den Körper vor malignen Entartungen im Vorfeld schützen könnte. Vitamin D könnte damit die Rolle eines protektiven Faktors im Hinblick auf die zelluläre Transformation einnehmen.

Bei der Betrachtung all dieser bisher genannten Punkte kann man zusammenfassend zu dem Ergebnis kommen, dass Vitamin D eine signifikante Zunahme der Infiltration von immunstimulatorischen Immunzellen in den Tumor auslöst, immunsupprimierende M2-Makrophagen unterdrücken könnte und das Überleben von Patienten mit einem Kopf-Hals-Karzinom im Vergleich zu den Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel deutlich verlängern könnte. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass es für Kopf-Hals-Tumorpatienten in jedem Stadium ihres Lebens wichtig ist, auf eine ausreichende Vitamin-D-Versorgung zu achten, was in mindestens gleichem Umfang auch Aufgabe der behandelnden Ärzte ist. Weiterhin erfordern die in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse zusätzliche Studien und Experimente, die die Wirkungen des Vitamin D auf den Körper und die antitumorale Aktivität des Immunsystems untersuchen. Nur so kann Vitamin D in Zusammenhang mit modernen Immunmodulatoren das Überleben von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich verbessern und eine Schnittstelle zwischen exogener und endogener Immunmodulation bilden. Dies ist nicht nur im Hinblick auf Karzinome relevant, sondern bezieht sich auch auf andere Krankheiten wie Autoimmundefekte und kardiovaskuläre Erkrankungen, die durch Vitamin D positiv beeinflusst werden können.

## 6. Literaturverzeichnis

- Adams, J.S. & Hewison, M., 2010. Update in Vitamin D. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95(2), pp.471–478.
- Alhamarneh, O. et al., 2008. Regulatory T cells: What role do they play in antitumor immunity in patients with head and neck cancer? *Head & Neck*, 30(2), pp.251–261.
- Allemani, C. et al., 2015. Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25676887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *The Lancet*, 385(9972), pp.977–1010.
- Arem, H. et al., 2011. Serum 25-hydroxyvitamin D and risk of oropharynx and larynx cancers in Finnish men. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 20(6), pp.1178–1184.
- Arnaud, J. & Constans, J., 1993. Affinity differences for vitamin D metabolites associated with the genetic isoforms of the human serum carrier protein (DBP). *Human genetics*, 92(2), pp.183–188.
- Attner, P. et al., 2010. The role of human papillomavirus in the increased incidence of base of tongue cancer. *International journal of cancer*, 55(Part 4), pp.764-772.
- Badoual, C. et al., 2006. Prognostic Value of Tumor-Infiltrating CD4<sup>+</sup> T-Cell Subpopulations in Head and Neck Cancers. *Clinical Cancer Research*, 12(2), pp.465-472.
- Baeke, F., Korf, H., et al., 2010. The Vitamin D Analog, TX527, Promotes a Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> Regulatory T Cell Profile and Induces a Migratory Signature Specific for Homing to Sites of Inflammation. *The Journal of Immunology*, 186(1), pp.132-142
- Baeke, F., Takiishi, T., et al., 2010. Vitamin D: modulator of the immune system. *Current Opinion in Pharmacology*, 10(4), pp.482-469
- Bann, D.V., Deschler, D.G. & Goyal, N., 2016. Novel Immunotherapeutic Approaches for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancers*, 8(10).
- Barnes, L., Chiosea, S.I. & Seethala, R.R., 2010. *Head and Neck Pathology*, Demos Medical Publishing.
- Battault, S. et al., 2012. Vitamin D metabolism, functions and needs: from science to health claims. *European Journal of Nutrition*, 52(2), pp.429-441
- Beatty, G.L. & Gladney, W.L., 2015. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. *Clinical Cancer Research*, 21(4), pp.687-692
- Berger, M.D. et al., 2017. A polymorphism within the vitamin D transporter gene predicts outcome in metastatic colorectal cancer patients treated with FOLFIRI/bevacizumab or FOLFIRI/cetuximab. *Clinical Cancer Research*, p.clincanres.1663.2017.
- Bergmann, C. et al., 2008. T Regulatory Type 1 Cells in Squamous Cell Carcinoma of the

- Head and Neck: Mechanisms of Suppression and Expansion in Advanced Disease. *Clinical Cancer Research*, 14(12), pp.3706-3715.
- Betiol, J. et al., 2013. Impact of HPV infection on the development of head and neck cancer. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 46(3), pp.217-226.
- Bischoff-Ferrari, H.A. et al., 2009. Dietary Calcium and Serum 25-Hydroxyvitamin D Status in Relation to BMD Among U.S. Adults. *Journal of Bone and Mineral Research*, 24(5), pp.935-942.
- Bittenbring, J.T. et al., 2014. Vitamin D Deficiency Impairs Rituximab-Mediated Cellular Cytotoxicity and Outcome of Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With but Not Without Rituximab. *Journal of Clinical Oncology*, 32(29), pp.3242–3248.
- Black, P.N. & Scragg, R., 2005. Relationship Between Serum 25-Hydroxyvitamin D and Pulmonary Function in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Chest*, 128(6), pp.3792–3798.
- Boenninghaus, H.-G. & Lenarz, T., 2001. *Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Boonstra, A. et al., 2001. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> Has a Direct Effect on Naive CD4<sup>+</sup> T Cells to Enhance the Development of Th2 Cells. *The Journal of Immunology*, 167(9), pp.4974–4980.
- Bothwell, K.D. et al., 2015. Impact of Short-term 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on the Chemopreventive Efficacy of Erlotinib against Oral Cancer. *Cancer Prevention Research*, 8(9), pp.765–776.
- Bouillon, R. et al., 2008. Vitamin D and Human Health: Lessons from Vitamin D Receptor Null Mice. *Endocrine Reviews*, 29(6), pp.726–776.
- Burnet, F.M., 1970. The Concept of Immunological Surveillance. In *Immunological Aspects of Neoplasia*. Progress in Tumor Research. S. Karger AG, pp. 1–27.
- Camargo, C.A., Jr. et al., 2006. Prospective Study Of Maternal Intake Of Vitamin D During Pregnancy And Risk Of Wheezing Illnesses In Children At Age 2 Years. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(3), pp.721–722.
- Cantorna, M.T., 2010. Mechanisms underlying the effect of vitamin D on the immune system. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69(03), pp.286–289.
- Carvalho, A.L. et al., 2004. Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: A site-specific analysis of the SEER database. *International journal of cancer*, 114(5), pp.806–816.
- Castellsagué, X. et al., 2003. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *International journal of cancer*, 108(5), pp.741–749.
- Chen, S. et al., 2007. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on human B cell differentiation. *The Journal of Immunology*, 179(3), pp.1634–1647.
- Chikamatsu, K. et al., 2007. Relationships between regulatory T cells and CD8<sup>+</sup> effector

- populations in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head & Neck*, 29(2), pp.120–127.
- Cowell, J.K., 2001. *Molecular Genetics of Cancer*, Gulf Professional Publishing.
- Dörr, J. et al., 2012. Efficacy of Vitamin D Supplementation in Multiple Sclerosis (EVIDIMS Trial): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, 13(1), p.1502.
- Elwood, J.M. et al., 1984. Alcohol, smoking, social and occupational factors in the aetiology of cancer of the oral cavity, pharynx and larynx. *International journal of cancer*, 34(5), pp.603–612.
- Enk, A.H. et al., 2000. High dose inhalation interleukin-2 therapy for lung metastases in patients with malignant melanoma. *Cancer*, 88(9), pp.2042–2046.
- Fenichel, R.L. & Chirigos, M.A., 1984. *Immune Modulation Agents and Their Mechanisms*, Marcel Dekker.
- Gaber, E. & Wildner, M., 2011. Sterblichkeit, Todesursachen und regionale Unterschiede. *Robert Koch Institut*, pp.1–54.
- Ganz, H. & Jahnke, V., 1996. *Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde*, Walter de Gruyter.
- Garbe, C., 2006. Plattenepithelkarzinom. In *Kompendium Internistische Onkologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 5121–5137.
- Garland, C. et al., 2008. Abstract ED07-03: Role of Vitamin D in prevention of cancer: dose-response relationships. *Cancer Prevention Research*, 1(7 Supplement), pp.ED07–03–ED07–03.
- Garland, C.F. et al., 2006. The Role of Vitamin D in Cancer Prevention. *American Journal of Public Health*, 96(2), pp.252–261.
- Garrote, L.F. et al., 2001. Risk factors for cancer of the oral cavity and oro-pharynx in Cuba. *British Journal of Cancer*, 85(1), pp.46–54.
- Gauzzi, M.C. et al., 2005. Suppressive effect of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on type I IFN-mediated monocyte differentiation into dendritic cells: impairment of functional activities and chemotaxis. *The Journal of Immunology*, 174(1), pp.270–276.
- Gerlinger, M. et al., 2012. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *New England Journal of Medicine*, 366(10), pp.883–892.
- Giovannucci, E. et al., 2006. Prospective Study of Predictors of Vitamin D Status and Cancer Incidence and Mortality in Men. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 98(7), pp.451–459.
- Gutierrez, M.G. et al., 2004. Autophagy Is a Defense Mechanism Inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis Survival in Infected Macrophages. *Cell*, 119(6), pp.753–766.
- Guttman, O. & C Lewis, E., 2016. M2-like macrophages and tumor-associated macrophages: overlapping and distinguishing properties en route to a safe therapeutic potential.

- Integrative Cancer Science and Therapeutics*, 3(5).
- Hashibe, M. et al., 2009. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 18(2), pp.541–550.
- Heaney, R.P., 2008. Vitamin D in health and disease. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 3(5), pp.1535–1541.
- Heaney, R.P., 2012. Vitamin D — Baseline Status and Effective Dose. *New England Journal of Medicine*, 367(1), pp.77–78.
- Heaney, R.P. et al., 2003. Calcium Absorption Varies within the Reference Range for Serum 25-Hydroxyvitamin D. *Journal of the American College of Nutrition*, 22(2), pp.142–146.
- Hewison, M., 2011. Vitamin D and innate and adaptive immunity. *Vitamins and hormones*, 86, pp.23–62.
- Hodi, F.S. et al., 2010. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 363(8), pp.711–723.
- Hof, H. & Dörries, R., 2017. *Medizinische Mikrobiologie*, Georg Thieme Verlag.
- Holick, M.F., 2013. Bioavailability of vitamin D and its metabolites in black and white adults. *New England Journal of Medicine*, 369(21), pp.2047–2048.
- Holick, M.F., 2006. The Photobiology of Vitamin D and Its Consequences for Humansa. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 453(1), pp.1–13.
- Holick, M.F., 2009. Vitamin D and Health: Evolution, Biologic Functions, and Recommended Dietary Intakes for Vitamin D. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism*, 7(1), pp.2–19.
- Holick, M.F., 2007. Vitamin D Deficiency. *New England Journal of Medicine*, 357(3), pp.266–281.
- Holick, M.F., 2005. Vitamin D: Important for Prevention of Osteoporosis, Cardiovascular Heart Disease, Type 1 Diabetes, Autoimmune Diseases, and Some Cancers. *Southern Medical Journal*, 98(10), pp.1024–1026.
- Janssens, W. et al., 2010. Vitamin D deficiency is highly prevalent in COPD and correlates with variants in the vitamin D-binding gene. *Thorax*, 65(3), pp.215–220.
- Kaatsch, P., Spix, C. & Kornelia, T., 2015. Krebs in Deutschland RKI. pp.1–8.
- Kansy, B. et al., 2015. Immunotherapy in head and neck cancer. *HNO*, 63(11), pp.797–803.
- Klionsky, D.J., 2000. Autophagy as a Regulated Pathway of Cellular Degradation. *Science*, 290(5497), pp.1717–1721.
- Kongsbak, M. et al., 2014. Vitamin D Up-Regulates the Vitamin D Receptor by Protecting It from Proteasomal Degradation in Human CD4+ T Cells M. Bradl, ed. *PLoS ONE*, 9(5), pp.e96695–12.

- Kreimer, A.R. et al., 2005. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 14(2), pp.467–475.
- Lamberg-Allardt, C., 2006. Vitamin D in foods and as supplements. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 92(1), pp.33–38.
- Lemire, J.M. et al., 1984. 1, 25-DIHYDROXYVITAMIN D<sub>3</sub> (1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) SUPPRESSES THE IN VITRO PROLIFERATION AND IMIUNOQABULIN PRODUCTION BY NORMAL HUMAN PERIPHERAL BLOOD CELLS. *Pediatric Research*, 18, pp.259A–259A.
- Linxweiler, M. & Schick, B., 2015. Reply to combination of p16 INK4a-Ki67 immunocytology and HPV polymerase chain reaction for the noninvasive analysis of HPV involvement in head and neck cancer. *Cancer Cytopathology*, 123(6), pp.382–383.
- Liu, P.T. et al., 2009. Convergence of IL-1 $\beta$  and VDR Activation Pathways in Human TLR2/1-Induced Antimicrobial Responses D. Unutmaz, ed. *PLoS ONE*, 4(6), p.e5810.
- Liu, P.T. et al., 2006. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science*, 311(5768), pp.1770–1773.
- Liu, W.-C. et al., 2015. Vitamin D and immune function in chronic kidney disease. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 450, pp.135–144.
- Lowe, H. et al., 2011. Vitamin D Toxicity due to a Commonly Available “Over the Counter” Remedy from the Dominican Republic. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96(2), pp.291–295.
- Löffler, G. & Petrides, P.E., 2013. *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer-Verlag.
- Lubin, J.H. et al., 2009. Total Exposure and Exposure Rate Effects for Alcohol and Smoking and Risk of Head and Neck Cancer: A Pooled Analysis of Case-Control Studies. *American Journal of Epidemiology*, 170(8), pp.937–947.
- Marur, S. et al., 2010. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *The Lancet Oncology*, 11(8), pp.781–789.
- Mehanna, H.M. & Ang, K., 2012. *Individualized Prognosis in Recurrent HNSCC* 2012 ed. H. M. Mehanna & K. Ang, eds., Stuttgart: Thieme Verlag.
- Meyer, F. et al., 2011. Dietary vitamin D intake and serum 25-hydroxyvitamin D level in relation to disease outcomes in head and neck cancer patients. *International journal of cancer*, 128(7), pp.1741–1746.
- Mora, J.R., Iwata, M. & Andrian, von, U.H., 2008. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nature reviews. Immunology*, 8(9), pp.685–698.
- Nissen, J. et al., 2014. Common Variants in CYP2R1 and GC Genes Predict Vitamin D Concentrations in Healthy Danish Children and Adults N. A. Ellis, ed. *PLoS ONE*, 9(2), p.e89907.
- Nnoaham, K.E. & Clarke, A., 2008. Low serum vitamin D levels and tuberculosis: a



- systematic review and meta-analysis. *International Journal of Epidemiology*, 37(1), pp.113–119.
- Okamoto, M. et al., 2006. Mechanism of Anticancer Host Response Induced by OK-432, a Streptococcal Preparation, Mediated by Phagocytosis and Toll-Like Receptor 4 Signaling. *Journal of Immunotherapy*, 29(1), pp.78–86.
- Pedersen, A.W. et al., 2009. Phenotypic and functional markers for 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D 3-modified regulatory dendritic cells. *Clinical & Experimental Immunology*, 157(1), pp.48–59.
- Pezzutto, A., Ulrichs, T. & Burmester, G.-R., 2007. *Taschenatlas der Immunologie*, Georg Thieme Verlag.
- Piemonti, L. et al., 2000. Vitamin D3 affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 164(9), pp.4443–4451.
- Preiß, J. et al., 2014. *Taschenbuch Onkologie*,
- Priehl, B. et al., 2013. Vitamin D and Immune Function. *Nutrients*, 5(7), pp.2502–2521.
- Provvedini, D.M. et al., 1983. 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in human leukocytes. *Science*, 221(4616), pp.1181–1183.
- Prüfer, K. et al., 2000. Dimerization with retinoid X receptors promotes nuclear localization and subnuclear targeting of vitamin D receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 275(52), pp.41114–41123.
- Ramqvist, T. & Dalianis, T., 2010. Oropharyngeal Cancer Epidemic and Human Papillomavirus. *Emerging Infectious Diseases*, 16(11), pp.1671–1677.
- Rassow, J. et al., 2016. *Duale Reihe Biochemie*, Georg Thieme Verlag.
- Reichrath, J. et al., 2016. Targeting the vitamin D endocrine system (VDES) for the management of inflammatory and malignant skin diseases: An historical view and outlook. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, pp.1–13.
- RemmeleStegner, 1987. Quantifizierung des Hormonrezeptorgehalts (Immunreaktiver Score = IRS). *Der Pathologe*, p.138.
- Rosen, C.J. et al., 2012. The Nonskeletal Effects of Vitamin D: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews*, 33(3), pp.456–492.
- Russell, S.M. et al., 2011. USC-HN2, a new model cell line for recurrent oral cavity squamous cell carcinoma with immunosuppressive characteristics. *Oral Oncology*, 47(9), pp.810–817.
- S, C. et al., 2007. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. *Journal of Immunology*, 179(3), pp.1634–1647.
- Schadendorf, D., 2015. Auf dem Weg zum Standard beim Melanom. *Deutsches Ärzteblatt* pp.1–3.

- Schmoll, H.-J., Höffken, K. & Possinger, K., 2013. *Kompendium Internistische Onkologie* H.-J. Schmoll, K. Höffken, & K. Possinger, eds., Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Sica, A. et al., 2015. Tumor-Associated Macrophages. In *Encyclopedia of Cancer*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 1–6.
- Simpson, S., Jr et al., 2010. Higher 25-hydroxyvitamin D is associated with lower relapse risk in MS. *Annals of Neurology*, 68(2), pp.193–203.
- Spitz, M.R. et al., 1988. Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. A case comparison analysis. *Cancer*, 61(1), pp.203–208.
- Strauss, L. et al., 2007. The frequency and suppressor function of CD4+CD25highFoxp3+ T cells in the circulation of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical Cancer Research*, 13(21), pp.6301–6311.
- Streppel, M.T. et al., 2009. Long-term wine consumption is related to cardiovascular mortality and life expectancy independently of moderate alcohol intake: the Zutphen Study. *Journal of Epidemiology & Community Health*, 63(7), pp.534–540.
- Thomas, L., 1982. On immunosurveillance in human cancer. *The Yale journal of biology and medicine*, 55(3-4), pp.329–333.
- Tsujikawa, T. et al., 2012. Autocrine and paracrine loops between cancer cells and macrophages promote lymph node metastasis via CCR4/CCL22 in head and neck squamous cell carcinoma. *International journal of cancer*, 132(12), pp.2755–2766.
- Tuohimaa, P. et al., 2004. Metabolism of 25-hydroxyvitamin D3 may explain the u-shaped risk curve for prostate cancer. *International journal of cancer*, 111(3), pp.469–469.
- Tuyns, A.J. et al., 1988. Cancer of the larynx/hypopharynx, tobacco and alcohol: Iarc international case-control study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France). *International journal of cancer*, 41(4), pp.483–491.
- van Halteren, A.G.S. et al., 2002. Redirection of human autoreactive T-cells Upon interaction with dendritic cells modulated by TX527, an analog of 1,25 dihydroxyvitamin D(3). *Diabetes*, 51(7), pp.2119–2125.
- Vaughan-Shaw, P.G. et al., 2017. The impact of vitamin D pathway genetic variation and circulating 25-hydroxyvitamin D on cancer outcome: systematic review and meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 116(8), pp.1092–1110.
- Vieth, R., 2007. Vitamin D Toxicity, Policy, and Science. *Journal of Bone and Mineral Research*, 22(S2), pp.V64–V68.
- Vineis, P. et al., 2004. Tobacco and Cancer: Recent Epidemiological Evidence. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 96(2), pp.99–106.
- White, A.N. et al., 2009. Let the sun shine in: effects of ultraviolet radiation on invasive pneumococcal disease risk in Philadelphia, Pennsylvania. *BMC Infectious Diseases*, 9(1), p.704.

- Wiers, K.M. et al., 2000. Vitamin D3 Treatment to Diminish the Levels of Immune Suppressive CD34+ Cells Increases the Effectiveness of Adoptive Immunotherapy. *Journal of Immunotherapy*, 23(1), pp.115–124.
- Wild, C.A., 2010. Toll-like Receptors in Regulatory T Cells of Patients With Head and Neck Cancer TLRs in T-reg Cells of HNSCC Patients. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 136(12), pp.1253–1259.
- Wolff, K.-D., Follmann, M. & Nast, A., 2012a. Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms. *Deutsches Ärzteblatt*, pp.1–10.
- Xie, Z. & Bikle, D.D., 1997. Cloning of the Human Phospholipase C- 1 Promoter and Identification of a DR6-type Vitamin D-responsive Element. *Journal of Biological Chemistry*, 272(10), pp.6573–6577.
- Young, M. & Day, T., 2013. Immune Regulatory Activity of Vitamin D3 in Head and Neck Cancer. *Cancers*, 5(3), pp.1072–1085.
- Yuk, J.-M. et al., 2009. Vitamin D3 Induces Autophagy in Human Monocytes/Macrophages via Cathelicidin. *Cell Host & Microbe*, 6(3), pp.231–243.
- Zella, J.B., McCary, L.C. & DeLuca, H.F., 2003. Oral administration of 1,25-dihydroxyvitamin D3 completely protects NOD mice from insulin-dependent diabetes mellitus. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 417(1), pp.77–80.
- Zhang, Y. et al., 2012. The GC, CYP2R1 and DHCR7 genes are associated with vitamin D levels in northeastern Han Chinese children. *Swiss Medical Weekly*.
- Zhou, C., 2006. Steroid and xenobiotic receptor and vitamin D receptor crosstalk mediates CYP24 expression and drug-induced osteomalacia. *Journal of Clinical Investigation*, 116(6), pp.1703–1712.
- Zittermann, A., 2006. Vitamin D and disease prevention with special reference to cardiovascular disease. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 92(1), pp.39–48.
- Zittermann, A. et al., 2013. Safety Issues of Vitamin D Supplementation. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry- Anti-Cancer Agents*, 13(1), pp.4–10.
- Zumbach, K. et al., 2000. Antibodies against oncoproteins E6 and E7 of human papillomavirus types 16 and 18 in patients with head-and-neck squamous-cell carcinoma. *International journal of cancer*, 85(6), pp.815–818.

## 7. Publikationen

### **Originalarbeiten:**

Bochen F, **Balensiefer B**, Körner S, Bittenbring JT, Neumann F, Koch A, Bumm K, Marx A, Wemmert S, Zuschlag D, Kühn JP, Schick B, Linxweiler M. **Vitamin D deficiency in head and neck cancer patients – prevalence, prognostic value and impact on immune function.**

*Manuscript submitted*

### **Poster mit Vortrag:**

**Balensiefer B**, Bochen F, Wagner M, Schick B, Linxweiler M. **Einfluss von Vitamin D auf die tumorspezifische Immunabwehr bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich.**

*Präsentiert auf der DGHNO-Jahrestagung 2017, 24. bis 17. Mai 2017, Erfurt*

## 8. Lebenslauf

### Name

Benedikt Balensiefer  
geboren am 28.11.1995 in Mechernich

### Anschrift

Kirrberger Str. 11A  
66424 Homburg/Saar

### Familienstand

Ledig

Vater: Wolfgang Balensiefer, Realschulkonrektor

Mutter: Dr. Dagmar Balensiefer, geb. Gerber, Fachärztin für Allgemeinmedizin



### Ausbildung

August 2002	-	Juni 2005	Katholische Grundschule Kommern
August 2005	-	Juni 2013	Privates Erzbischöfliches St. Angela Gymnasium Bad Münstereifel Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Ø 1,3)
Oktober 2013	-	August 2015	Vorklinischer Abschnitt des Studiums der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes 1. Staatsexamen (Note 2,5)
September 2015	-	Heute	Klinischer Abschnitt des Studiums der Humanmedizin

### Fremdsprachenkenntnisse

Latein: großes Latinum  
Englisch: (8 Jahre), fließend

### Hobbys

Klavier  
Volleyball  
Tennis

### 9. Danksagung

Ohne die Hilfe und die Unterstützung von vielen Personen wäre es mir nicht möglich gewesen, diese Arbeit zu verfassen.

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr. Bernhard Schick (Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes) außerordentlich für die Möglichkeit, meine Arbeit an seiner Klinik schreiben zu dürfen, die überaus freundliche Aufnahme und die hervorragende Betreuung sowie für die Überlassung des Arbeitsplatzes danken.

Herrn PD Dr. Maximilian Linxweiler (Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes) danke ich für das Überlassen des hochinteressanten Themas, die überragende Unterstützung bei meiner Arbeit sowie die jederzeit mögliche Diskussionsbereitschaft und die wahnsinnig schnelle Hilfe im Falle einer Frage oder eines Problems.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Herrn Florian Bochen (Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes) bedanken. Jederzeit gewährte er mir bei der Planung, Durchführung und Auswertung außerordentlich sachkundige, erfahrene und wertvolle Unterstützung. Dankbar anerkennen will ich auch die freundliche, immer geduldige Bereitschaft, mir Dinge der Molekularbiologie näherzubringen.

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Rainer Bohle und Herrn PD Dr. Matthias Wagner (Klinik für Pathologie Universität des Saarlandes) für die Bereitstellung der FFPE-Gewebeschnitte, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Herrn PD Dr. Matthias Wagner danke ich außerdem für seine Bereitschaft, sein Engagement, mir bei der Auswertung und statistischen Bearbeitung zu helfen.

Frau Ulrike Bechtel und Frau Monika Hoffmann (Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes) danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die ständige Hilfsbereitschaft während der Etablierung, den Versuchen und des Laboralltags.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.